

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

Desarrollo farmacéutico de una formulación de amoxiciloil octa L-lisina en el diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata al antibiótico β -lactámico: amoxicilina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Francisca Arribas Poves

Directores

M^a Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado
Ricardo Palacios Peláez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



DESARROLLO FARMACÉUTICO DE UNA
FORMULACIÓN DE AMOXICILOIL OCTA L-LISINA EN
EL DIAGNÓSTICO DE LA HIPERSENSIBILIDAD
INMEDIATA AL ANTIBIÓTICO β -LACTÁMICO:
AMOXICILINA.

TESIS DOCTORAL

DIRIGIDA POR:

Dra. M^a PILAR GÓMEZ-SERRANILLOS CUADRADO

Dr. RICARDO PALACIOS PELÁEZ

MARÍA FRANCISCA ARRIBAS POVES
MADRID, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Dra. Dña. M^a Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Dr. Don. Ricardo Palacios Peláez, Profesor asociado del Departamento de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Estado de Louisiana (LSUHSC).

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral presentada por Dña. María Francisca Arribas Poves, titulada “Desarrollo farmacéutico de una formulación de Amoxiciloil octa L-Lisina en el diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata al antibiótico β -lactámico: Amoxicilina”, ha sido realizada bajo nuestra inmediata dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Madrid, Septiembre 2017

M^a Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado

Ricardo Palacios Peláez

A Irene, Rodrigo y Jesús, por el apoyo que me han dado y las horas que esta tesis me
ha privado de estar con ellos.

Nunca desistas de un sueño, sólo trata de ver las señales que te llevan a él
Paulo Coelho.

El presente trabajo ha sido posible gracias a la dedicación y colaboración de varias personas, a las que me gustaría mostrarles mi más sincero agradecimiento.

De manera muy especial quiero expresar mi gratitud a mis directores de tesis, el Dr. Ricardo Palacios Peláez y la Dra. M^a Pilar Gómez-Serranillos. A Ricardo no sólo por ofrecerme la posibilidad de realizar este trabajo doctoral y su magistral aportación y dirección de la misma. Si no también por la oportunidad de brindarme la posibilidad de ser un profesional en el campo de la industria farmacéutica. A Pilar por abrirme las puertas de su casa y haberme ofrecido todo su apoyo, ánimo y profesionalidad día a día para poder culminar esta Tesis Doctoral.

Al Dr. David Rodríguez Gil, por compartir conmigo sus amplios conocimientos de inmunología, por prestarme su ayuda para poder recorrer este camino hacia el doctorado, y por su compañerismo y amistad.

A mi amiga Teresa Carrasco Moreno y a su marido el Dr. Antonio Chana López, por su paciencia y cariño, por trasmitirme sus conocimientos en síntesis y caracterización físicoquímica. Y por ofrecerme su experiencia investigadora.

Al Dr. Fernando Pineda de la Losa, por su inestimable ayuda en la revisión de los artículos científicos y position paper.

A Julián Campos Fernández, por su gran aportación en esta tesis, sin la cual hubiese sido imposible llevarla a término. Y por confiar más en mí que yo misma.

A todos mis compañeros de Laboratorios Diater, S.A, por su desinteresada ayuda y por sus palabras de aliento y firmeza, que han hecho posible que el difícil camino del Doctorando sea más agradable y divertido. Y por hacer del trabajo diario una experiencia entrañable y enriquecedora.

A mis amigas desde mi infancia Mónica, Carolina y Carmina, por su apoyo incondicional, por demostrar su cariño desmedido entendiendo el tiempo, la dedicación y el esfuerzo que han supuesto las páginas de esta tesis.

El mayor agradecimiento va dirigido a mi familia. A mi padre Paco, siempre estará en mi corazón, este trabajo es tuyo!! A mi madre Julia y mis hermanas Rocío y Montse, por quererme y enseñarme todos los valores que me han convertido en lo que soy. Y por darme la oportunidad de aprender y hacer lo que siempre me ha gustado. No puedo haber tenido un mejor modelo en mi vida.

Por último, el agradecimiento más especial es para mi marido Jesús, sin su comprensión, esfuerzo y paciencia día a día, no hubiese sido posible terminar este trabajo. Gracias por acompañarme en el viaje de mi vida, por estar ahí en los buenos y malos momentos, y por entenderme para que este proyecto se haya hecho realidad. Sin ti yo no hubiera llegado hasta aquí.

ABREVIATURAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
ÍNDICE DE TABLAS.....	17
RESUMEN.....	21
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	27
1. Las enfermedades alérgicas.....	27
2. Anticuerpos.....	30
2.1 Conceptos Generales.....	30
2.2 Tipos y funciones de los anticuerpos.....	31
3. Hipersensibilidad inmediata.....	35
3.1 Mastocitos.....	36
3.2 Basófilos.....	37
3.3 Activación de mastocitos y basófilos.....	37
3.3.1 Mediadores derivados de mastocitos y basófilos.....	38
3.3.1.1 Mediadores preformados.....	39
3.3.1.2 Mediadores de nueva síntesis.....	40
3.4 Eosinófilos.....	41
3.5 Mecanismos de la reacción alérgica.....	42
4. Antibióticos.....	45
4.1 Resistencias.....	48
4.2 Hipersensibilidad inmediata a antibióticos β -lactámicos.....	49
4.2.1 Clasificación de las reacciones.....	52
4.2.1.1 Reacciones inmediatas.....	52
4.2.1.2 Reacciones aceleradas.....	52
4.2.1.3 Reacciones tardías.....	52
4.3 Diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata a antibióticos β -lactámicos.....	53
4.3.1 Diagnóstico “in vivo”.....	54
4.3.2 Diagnóstico “in vitro”.....	57
OBJETIVOS.....	63
MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. Materiales de Partida.....	67
1.1 Amoxicilina Sódica.....	67
1.1.1 Productos de degradación de la amoxicilina sódica.....	67
1.2 Octa L-lisina.....	71
1.3 Amoxiciloil octa L-Lisina (APL).....	74
1.3.1 Síntesis de amoxiciloil octa-L-lisina.....	74
1.3.2 Caracterización de amoxiciloil octa L Lisina (APL).....	78
1.3.2.1 Valoración de pureza y sustancias relacionadas de amoxiciloil octa-L lisina.....	79
1.3.2.2 RMN resonancia magnética nuclear de amoxiciloil octa L-Lisina.....	81
1.3.2.3 IR: Infrarrojos de amoxiciloil octa L-Lisina.....	82
1.3.2.4 Determinación del contenido en agua de amoxiciloil octa L-lisina.....	82
1.3.2.5 Contenido de disolventes residuales de amoxiciloil octa L-lisina.....	82
1.3.2.6 Perfil de estabilidad de amoxiciloil octa L-lisina.....	82
2. Ensayo de perfil de seguridad en animales de amoxiciloil octa L-lisina.....	83

2.1 Toxicidad aguda: Dosis máxima no irritante.....	83
2.2 Toxicidad subaguda.....	86
2.3 Tratamiento estadístico: toxicidad en animales.....	91
3. Modelos Celulares: Liberación de histamina (HR).....	91
3.1 Selección de pacientes.....	92
3.2 Recopilación, preparación y almacenamiento de las muestras de sangre.....	92
3.3 Aislamiento y sensibilización pasiva de basófilos con IgE específica.....	92
3.4 Procedimiento.....	93
3.5 Tratamiento estadístico: Liberación de histamina por parte de basófilos.....	93
4. Programa Clínico.....	93
4.1 Diseño y características principales.....	94
4.2 Objetivo.....	94
4.3 Población.....	94
4.4 Ensayo.....	95
4.5 Variables del ensayo.....	96
4.6 Procedimiento del estudio.....	97
4.7 Desarrollo del ensayo.....	98
4.8 Lectura e interpretación de los resultados de las pruebas cutáneas.....	99
4.9 Evaluación de las respuestas: eficacia y seguridad.....	100
4.10 Cálculo del número de pacientes.....	100
4.11 Parámetros estadísticos empleados.....	101
5. Análisis estadístico.....	101
RESULTADOS.....	105
1. Amoxiciloil octa-L-Lisina.....	105
1.1 Síntesis de amoxiciloil octa L-lisina (APL).....	105
1.2 Caracterización de amoxiciloil octa L-lisina (APL).....	106
1.2.1 Valoración de pureza de amoxiciloil Octa L-Lisina por HPLC: Validación del método analítico.....	106
1.2.2 Valoración de sustancias relacionadas de amoxiciloil Octa L-Lisina por HPLC: Validación del método analítico.....	109
1.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de amoxiciloil octa L-Lisina.....	122
1.2.4 Infrarrojos de amoxiciloil octa L-Lisina.....	124
1.2.5 Identificación, pureza, valoración de impurezas, contenido en agua, contenido de disolventes residuales de amoxiciloil octa L lisina (APL).....	124
1.2.6 Perfil de estabilidad: resultados de estabilidad de la amoxiciloil octa -L-lisina (APL).....	125
2. Perfil de seguridad de amoxiciloil octa L-lisina (APL).....	127
2.1 Toxicidad aguda: Resultados de la dosis máxima no irritante.....	127
2.2 Toxicidad subaguda; resultados a dosis repetidas.....	129
3. Modelos celulares: Liberación de Histamina (HR).....	133
4. Programa clínico; resultados del ensayo clínico.....	138
DISCUSIÓN.....	145
CONCLUSIONES.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	161
Anexos.....	175

ABREVIATURAS

%Pac	Tanto por ciento de principio activo
l	Longitud de la cubeta (cm)
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
5-HETE	Ácido 5-hidroxeicosatetranoico
5-HPETE	Ácido 5-hidroperoxieicosatetranoico
a.a.	Aminoácido
A	Absorbancia
a	Verdaderos positivos (VP)
A₇PL	Amoxiciloil hepta-l-lisina
A₉PL	Amoxiciloil nona-l-lisina
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ACN	Acetonitrilo
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ANOVA	Análisis de la varianza
AP	Ampicilina
APCs	Células presentadoras de antígeno
A₈PL	Amoxiciloil octa L Lisina
As	Factor de asimetría
AX	Amoxicilina
Boc	tert-butoxicarbonilo
BPP	Proteína específica básica
c	Falsos negativos (FN)
C18 PFP	Cadenas de 18 carbonos combinadas con radicales pentafluorofenil propil
C1q	Subunidad del factor del complemento
CAS	Chemical Abstracts Service. Identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones
CaCl₂	Cloruro Cálculo
CC	Quimiocinas CC
CD4+	Receptor de célula T para reconocimiento moléculas HLA clase II
CLAV	Ácido clavulánico
ClTrt-resina	2-cloro tritilo
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
CONH	Grupo amida
CRD	Cuaderno de recogida de datos
CV	Coefficiente de variación
CXC	Quimiocinas CXC
CH₂	Metileno
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃	Metilo
D	Dalton
Da	Daltons
DAG	Diacilglicerol
DCs	Células dendríticas
Desv. est	Desviación estándar

Abreviaturas

DIEA	N-etildiisopropilamina
DIPCDI	N, N'-diisopropilcarbodiimida
DM	Determinante menor de penicilina
DMF	N, N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d⁶	Dimetilsulfóxido deuterado
DRESS	Síndrome de sensibilidad a drogas con eosinofilia y síntomas sistémicos
E1	Epóxido Hidroxilasa
E2	LTC Sintetasa
E3	Glutamil transpeptidasa
E4	Dipeptidasa
EAACI	Academia Europea de alergia e Inmunología Clínica
ECDC	Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades
ECP	Proteína catiónica del eosinófilo
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
EEC	Comunidad económica europea
ENDA	Grupo de trabajo de alergia al medicamento
Eq	Equivalentes
EUDRACT	Base de datos de ensayos clínicos europeos
F	Femenino
Fab	Fracción de unión al antígeno
Fc	Fracción constante o fragmento cristalizante
FcεRI	Receptor de alta afinidad IgE
FcεRII	Receptor de baja afinidad IgE
FEIA	Fluoroenzima inmunoensayo
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
FP	Falsos Negativo
FT-IR	Fourier- Transform Infrared Espectrofotómetro
g	gramo
GM-CSF	Factor estimulador de crecimiento de granulocitos y macrófagos
H	Horas
H_{1...4}	Tipo de receptor para la histamina
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HClO₄	Ácido perclórico
HLA	Antígenos de leucocitos humanos
HOBt	Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HR	Humedad relativa
HRT	Técnica de liberación de histamina
HSA	Albúmina sérica humana
IC	Intervalo de confianza
ID	Intradermo reacción

IECAs Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina
IgE, G, A, D, M Inmunoglobulinas E, G, A, D, M
IL 1 β , 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 25, 31, 33 Interleuquina 1 β , 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 25, 31, 33
IP3 Fosfatidilinositol
IR Infrarrojo
K₂HPO₄ Difosfato de potasio
KBr Bromuro de potasio
KH₂PO₄ Fosfato monopotásico
KU/L Kilo Unidades/ Litro
L-lysyl L lisina
LT..C..D..E Leucotrienos de clases C...,D...,E..
LT Leucotrienos
M Masculino
M Molar
MeOH Metanol
mg miligramos
MgCl₂ Cloruro magnésico
MHC Complejo mayor de histocompatibilidad
MHz Megahercios
min Minutos
MIP-1 α Proteínas inflamatorias de macrófagos 1 α
mL mililitros
mm milímetros
mM milimolar
MNIC Concentración máxima no irritante
N Negativo
N Número de platos teóricos
NaOH Hidróxido sódico
ND No detectable
NH₂ Grupo amina
NK Células *Natural Killer*
nm Nanómetros
NR No realizado
°C Grados celsius
OCDE Guidelance for the testing of chemicals
OCDE Organización para la cooperación y el desarrollo económicos
OPA Phtaldialdehido
P Positivo
PAF Factor activador de plaquetas
PBP Proteínas fijadoras de penicilinas
PBS Tampón fosfato
PEI Producto en fase de investigación clínica
Pen G Penicilina G
PGD2 Prostaglandinas D2

Abreviaturas

pH	Potencial hidrógeno
PLA 2	enzima fosfolipasa A2
PM	Peso molecular
PPL	Peniciloil polilisina
ppm	Partes por millón
r²	Coefficiente de correlación
RAST	Enzimoinmunoensayo en fase sólida en discos de celulosa (<i>Radio Allergo Sorbent Test</i>)
RD	Real decreto
RI	Rango intercuartílico
Rf	Pulso de radiación
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROC	Curva de características operacionales del receptor
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensibilidad
SDS	Dodecil sulfato sódico
SPT	Prueba cutánea ("Skin prick test")
tBu	Ter-butilo
TCRs	Receptores de las células T específicas para el complejo de histocompatibilidad
TFA	Trifluoroacético
T_h1, T_h2, T_h9, T_h17, T_h22	Subpoblación del linfocito colaborador
TOCSY	Espectroscopia de Correlación Total (Total Correlation Spectroscopy)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TR	Tiempo de retención
UI	Unidad internacional
Uv	Ultravioleta
VCAM-1	Proteína de adhesión celular vascular
VLA-4(CD49dCD29)	Integrina dímero, compuesta por CD49d (alpha 4) y CD29 (beta 1)
VN	Verdaderos negativos
VP	Verdaderos positivos
Wh	Designa la anchura del pico en la mitad de su altura, en milímetros
Y	Peso de la resina (g)
Z	Funcionalización de la resina mmol/g
α	Alfa
γ	Gamma
δ	Delta
ϵ	Épsilon
ϵBP	Galectina 3
Λ	Longitud de onda.
μ	Mu
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
ξ	absortividad molar (L x mol ⁻¹ x cm ⁻¹)

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Figura 1.	Molécula de IgE.....	31
Figura 2.	Estructuras de las inmunoglobulinas.....	32
Figura 3.	Inmunoglobulina M.....	32
Figura 4.	Inmunoglobulina G y D.....	33
Figura 5.	Inmunoglobulina A.....	33
Figura 6.	Esquema de la IgE de membrana.....	34
Figura 7.	Fase de desensibilización y fase efectora; hipersensibilidad inmediata.....	36
Figura 8.	Esquema de mediadores liberados por mastocitos y basófilos y efectos fisiológicos provocados..	38
Figura 9.	Mediadores de nueva síntesis. Metabolismo de ácido araquidónico.....	41
Figura 10.	Mecanismo de la reacción alérgica.....	43
Figura 11.	Prevalencia del uso de antibióticos.....	45
Figura 12.	Determinantes antigénicos.....	50
Figura 13 y 18.	Estructura de Amoxicilina sódica.....	51 y 67
Figura 14.	Fase de sensibilización al medicamento.....	53
Figura 15.	Fase efectora, después de la re-exposición al medicamento.....	53
Figura 16.	Algoritmo de diagnóstico preconizado por el grupo ENDA.....	57
Figura 17.	Esquema del proceso de fluorescencia de Inmunocap.....	58
Figura 19.	Mecanismos de degradación de la amoxicilina sódica.....	68
Figura 20.	Estructura de la Impureza A de la amoxicilina sódica.....	68
Figura 21.	Estructura de la Impureza B de la amoxicilina sódica.....	68
Figura 22.	Estructura de la Impureza C de la amoxicilina sódica.....	69
Figura 23.	Estructura de la Impureza D de la amoxicilina sódica.....	69
Figura 24.	Estructura de la Impureza E de la amoxicilina sódica.....	69
Figura 25.	Estructura de la Impureza F de la amoxicilina sódica.....	69
Figura 26.	Estructura de la Impureza G de la amoxicilina sódica.....	70
Figura 27.	Estructura de la Impureza H de la amoxicilina sódica.....	70
Figura 28.	Estructura de la Impureza I de la amoxicilina sódica.....	70
Figura 29.	Estructura de la Impureza J de la amoxicilina sódica.....	70
Figura 30.	Estructura de la Impureza K de la amoxicilina sódica.....	70
Figura 31.	Estructura de octa L- lisina.....	71
Figura 32.	Esquema de síntesis de octalisina.....	73
Figura 33.	Esquema de síntesis y purificación de APL.....	76
Figura 34.	Esquema de proceso de síntesis de APL.....	77
Figura 35.	Esquema de las zonas de administración en la toxicidad subaguda.....	89
Figura 36.	Esquema de diseño y desarrollo del estudio clínico.....	99
Figura 37.	Molécula de APL.....	105
Figura 38.	Linealidad y rango APL.....	106
Figura 39.	Solución Estándar de APL.....	107
Figura 40.	Linealidad y rango de ácido amoxiciloico.....	110
Figura 41.	Linealidad y rango de amoxicilina sódica.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Figura 42.	Linealidad y rango de dicetopiperacina.....	111
Figura 43.	Cromatograma solución estándar Impurezas conocidas.....	112
Figura 44.	Solución estándar Impurezas desconocidas.....	112
Figura 45.	Linealidad y rango Impurezas desconocidas.....	118
Figura 46.	Cromatograma del estándar de APL degradado con HCl 1M, durante 24 horas.....	119
Figura 47.	Cromatograma del estándar de APL degradado en agua y en presencia de luz natural, durante 24 horas.....	120
Figura 48.	Cromatograma del estándar de APL degradado a 100°C en sólido, durante 24 horas.....	120
Figura 49.	¹ H-NMR (DMSO-d ₆) de APL.....	123
Figura 50.	¹³ C-NMR (DMSO-d ₆) de APL.....	123
Figura 51.	IR de APL.....	124
Figura 52.	Correlación entre APL y Amoxicilina para los nanogramos de histamina liberada.....	137
Figura 53.	Comparación de resultados de la técnica liberación de histamina para amoxicilina y APL entre pacientes y controles.....	137
Figura 54.	Curvas ROC generadas después de la comparación de amoxicilina y APL en la técnica de liberación de histamina de pacientes alérgicos vs pacientes no alérgicos.....	138

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Descripción	Página
Tabla 1.	Hitos históricos en el conocimiento de la alergia.....	28
Tabla 2.	Receptores de la IgE.....	34
Tabla 3.	Tipos y localización de mastocitos.....	37
Tabla 4.	Efectos de la histamina.....	39
Tabla 5.	Diagnósticos “skin prick test” versus pruebas intradérmicas.....	56
Tabla 6.	Concentraciones en pruebas cutáneas con antibióticos β -lactámicos.....	56
Tabla 7.	Valores de IgE antígeno-específica.....	59
Tabla 8.	Solubilidad de amoxicilina sódica.....	67
Tabla 9.	Pruebas de colmatación de la octalisina y la amoxicilina sódica.....	74
Tabla 10.	Gradiente del método de purificación.....	75
Tabla 11.	Gradiente del método analítico.....	76
Tabla 12.	Gradiente de valoración de principio activo.....	80
Tabla 13.	Frecuencia de análisis durante el estudio de estabilidad.....	82
Tabla 14.	Características del sistema para la determinación de MNIC.....	83
Tabla 15.	Instalaciones de los animales para la determinación de MNIC.....	84
Tabla 16.	Recinto animal para la determinación de MNIC.....	84
Tabla 17.	Descripción del número de animales, concentraciones y volúmenes de dosis en la determinación de MNIC.....	85
Tabla 18 y 24.	Escala de eritema y edemas según OECD guideline.....	86 y 90
Tabla 19.	Características del sistema para la determinación de la toxicidad subaguda.....	87
Tabla 20.	Instalaciones de los animales para la determinación de la toxicidad subaguda.....	87
Tabla 21.	Recinto animal para la determinación de la toxicidad subaguda.....	88
Tabla 22.	Distribución de los grupos en la determinación de la toxicidad subaguda.....	89
Tabla 23.	Características de la administración en la determinación de la toxicidad subaguda.....	89
Tabla 25.	Linealidad y rango para la valoración de APL.....	106
Tabla 26.	Exactitud para la valoración de APL.....	107
Tabla 27.	Precisión del sistema para la valoración de APL.....	108
Tabla 28.	Precisión del método para la valoración de APL.....	108
Tabla 29.	Precisión intermedia para la valoración de APL.....	109
Tabla 30.	Idoneidad del sistema para la valoración de APL.....	109
Tabla 31.	Linealidad y rango para la impureza conocida; ácido amoxiciloico.....	110
Tabla 32.	Linealidad y rango para la impureza conocida; amoxicilina sódica.....	110
Tabla 33.	Linealidad y rango para la impureza conocida; dicetopiperacina.....	111
Tabla 34.	Exactitud para la impureza conocida; ácido amoxiciloico.....	113
Tabla 35.	Exactitud para la impureza conocida; amoxicilina sódica.....	113
Tabla 36.	Exactitud para la impureza conocida; dicetopiperacina.....	113
Tabla 37.	Precisión del sistema para la impureza conocida; ácido amoxiciloico.....	114
Tabla 38.	Precisión del sistema para la impureza conocida; amoxicilina sódica.....	114
Tabla 39.	Precisión del sistema para la impureza conocida; dicetopiperacina.....	114
Tabla 40.	Precisión del método para la impureza conocida; ácido amoxiciloico.....	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Descripción	Página
Tabla 41.	Precisión del método para la impureza conocida; amoxicilina sódica.....	115
Tabla 42.	Precisión del método para la impureza conocida; dicetopiperacina.....	115
Tabla 43.	Precisión intermedia para la impureza conocida; ácido amoxiciloico.....	116
Tabla 44.	Precisión intermedia para la impureza conocida; amoxicilina sódica.....	116
Tabla 45.	Precisión intermedia para la impureza conocida; dicetopiperacina.....	116
Tabla 46.	Idoneidad para las impurezas conocidas.....	117
Tabla 47.	Linealidad y rango para impurezas desconocidas.....	118
Tabla 48.	Precisión del sistema para impurezas desconocidas.....	121
Tabla 49.	Precisión del método para impurezas desconocidas.....	121
Tabla 50.	Precisión intermedia para impurezas desconocidas.....	122
Tabla 51.	Espectro de IR para la molécula de APL.....	124
Tabla 52.	Resultados analíticos de los 3 lotes de APL.....	125
Tabla 53.	Resultados de estabilidad del experimento 110516.....	126
Tabla 54.	Resultados de estabilidad del experimento 110530.....	126
Tabla 55.	Resultados de estabilidad del experimento 110627.....	126
Tabla 56.	Criterios de positividad animal para las concentraciones medidas de APL.....	127
Tabla 57.	Puntuación media de eritema y edema.....	130
Tabla 58.	Características clínicas y demográficas de pacientes positivos de HR.....	134
Tabla 59.	Características clínicas y demográficas de pacientes negativos de HR.....	135
Tabla 60.	Concentración de histamina en los pacientes positivos.....	136
Tabla 61.	Datos obtenidos de la liberación de histamina.....	136
Tabla 62.	Curvas ROC comparativas de amoxicilina y APL.....	138
Tabla 63.	Características clínicas y demográficas de los pacientes del ensayo clínico.....	139
Tabla 64.	Resultados obtenidos con las pruebas de la molécula APL en el ensayo clínico.....	140
Tabla 65.	Resultados obtenidos de la sensibilidad de la molécula APL en el ensayo clínico.....	140

RESUMEN/SUMMARY

La alergia a medicamentos constituye la tercera causa más frecuente de consulta en los Servicios de alergología. Siendo la amoxicilina, la causa más frecuente de alergia a β -lactámicos, representando un 70% de los casos en España. Esto es debido principalmente a los cambios en el uso y la elección de los antibióticos β -lactámicos, así aquellos sujetos expuestos a la amoxicilina representan un número más elevado.

Las reacciones alérgicas a antibióticos β -lactámicos se definen como inmediatas y tardías. Las tardías en general son atribuibles a un mecanismo de células T específico, mientras que las inmediatas, son aquellas mediadas por un mecanismo IgE, siendo estas últimas más susceptibles de una evaluación más cuidadosa porque son las que conllevan un riesgo vital.

Aunque en la actualidad el grupo de trabajo en Alergia a Medicamentos (ENDA) y la Academia Europea de Alergia e Immunología Clínica (EAACI) publicó una guía con recomendaciones en relación con la hipersensibilidad a antibióticos β -lactámicos, donde incluía la amoxicilina en su algoritmo de diagnóstico, se ha comprobado que las pruebas cutáneas o “in vitro” con determinantes menores de amoxicilina, no mejoran el diagnóstico de pacientes con reacciones alérgicas a la amoxicilina.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo farmacéutico de una formulación, Amoxiciloil octa L-Lisina (APL), y la evaluación de su capacidad diagnóstica “in vitro” e “in vivo” en el diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata al antibiótico β -lactámico: Amoxicilina.

La molécula procede de la unión de ocho cadenas de lisinas unidas cada una de ellas a un resto de amoxiciloico. Se realizaron tres experimentos siguiendo la ruta de síntesis propuesta para demostrar la robustez del proceso de fabricación. Los tres experimentos se analizaron y caracterizaron según los métodos descritos, obteniéndose valores de pureza superiores al 95%, el contenido en sustancias relacionadas fue inferior al 5%, y el contenido de humedad menor al 7%. Los datos de estabilidad han demostrado que se trata de una sustancia estable durante 12 meses en condiciones de 5°C y 25°C y 60%HR (Humedad Relativa), que sometida a degradaciones forzadas ofrece mejores resultados de estabilidad que la Amoxicilina sódica.

Para asegurarse que las respuestas de aumento de pápula obtenidas en el ensayo clínico realizado con amoxiciloil octa L-lisina, eran debidas a la respuesta IgE mediada de tipo I y no a una irritación no específica, se estudio el perfil de seguridad de la molécula en animales. La toxicidad aguda permitió conocer que la concentración máxima no irritante (CMNI) para el APL, se encuentra por encima de 20 mg/mL. A su vez la toxicidad subaguda, indicó que la concentración de 0,5 mg/mL era no irritante.

Se realizó un ensayo clínico que fue prospectivo, unicéntrico, abierto y controlado con un método de referencia (diagnóstico clínico). Tuvo como objetivo evaluar y obtener la dosis y seguridad del producto de diagnóstico; APL. Se realizó con quince pacientes diagnosticados como alérgicos a aminopenicilinas. Se testearon varias concentraciones; 0,01 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL y 0,5 mg/mL en dos vías de administración diferentes; “skin prick test” y vía intradérmica. La concentración de 0,5 mg/mL fue la única que presentó una sensibilidad del

93,3%, y no originó ninguna reacción adversa.

La molécula de APL mejora la precisión diagnóstica “in vitro” de las reacciones alérgicas a la Amoxicilina. Los estudios realizados comparando la Amoxicilina y la molécula de APL en la técnica de liberación de histamina, que cuantifica la liberación específica de la histamina a partir de basófilos recubiertos de IgE específica a Amoxicilina y la molécula de APL, demostraron una sensibilidad del 78,95% y una especificidad del 100% para la molécula de APL, frente a una sensibilidad del 63,16% y una especificidad del 90% obtenida para la Amoxicilina.

Así, como resumen a todos los resultados presentados en este trabajo, podemos concluir que la haptenización de la molécula de Amoxicilina sódica con octa L-Lisina dando como resultado la molécula de APL permite: a) la obtención de una sustancia de mayor estabilidad que la Amoxicilina sódica, b) demostrar que esta molécula es válida para el desarrollo de un test cutáneo de mayor valor predictivo en la confirmación de casos de hipersensibilidad inmediata a derivados de la Amoxicilina sódica, c) disponer de un reactivo con utilidad en el diagnóstico “in vitro”, con especial interés en aquellos pacientes donde el diagnóstico “in vivo” puede suponer un riesgo.

Drug allergy is the third most frequent cause of allergy consultation. Amoxicillin is the most common cause of allergy to beta-lactams, accounting for 70% of cases in Spain. This is mainly due to changes in the use and choice of beta-lactam antibiotics, thus those exposed to Amoxicillin represent a higher number.

Allergic reactions to beta-lactams are defined and accepted as immediate and late reactions. Late reactions in general are attributable to a specific T cell mechanism, while the immediate reactions are those mediated by an IgE mechanism, being more susceptible to a more careful evaluation because they are the ones that carry a vital risk.

Although the Medication Allergy (ENDA) and European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) working group published a guide with recommendations regarding hypersensitivity to beta-lactam antibiotics, including Amoxicillin in its Diagnosis algorithm; it's been shown that that skin or "in vitro" tests with lower determinants of amoxicillin, don't improve the diagnosis of patients with allergic reactions to Amoxicillin.

The objective of this work is the pharmaceutical development of a formulation called Amoxicillin octa L-lysine (APL), and to evaluate its "in vitro" and "in vivo" diagnostic capacity of immediate hypersensitivity to amoxicillin sodium.

The molecule comes from the union of 8 chains of lysines each linked to an amoxycyclic residue. Three experiments were synthesized to demonstrate the robustness of the manufacturing process, and were characterized and analysed according to methods described. A purity greater than 95% was obtained in all three experiments, a content of related substances of less than 5%, and a moisture content of less than 7%. Stability data have shown that it is a stable substance for 12 months under conditions of 5 ° C and 25 ° C and 60% RH, which undergo forced degradation offers better results than Amoxicillin sodium.

To ensure that the papule augmentation responses obtained in the Amoxicillin octa L-lysine clinical trial, were due to the type I-mediated IgE response and not to nonspecific irritation, the safety profile was studied in animals. Acute toxicity revealed that the maximum non-irritant concentration (MNIC) for APL is above 20 mg / mL. And subacute toxicity indicated that the concentration of 0.5 mg / mL was non-irritant.

A clinical trial was performed that was prospective, unicentric, open and controlled with a reference method (clinical diagnosis). It aimed to evaluate and obtain the dosage and safety of the diagnostic product; Amoxicilioyl octa L lysine. It was performed with 15 patients classified as allergic to aminopenicillins. Testing various concentrations; 0.01 mg/mL; 0.05 mg/mL; 0.1 mg / mL and 0.5 mg/mL in two different routes of administration; skin prick test and intradermal route. The concentration of 0.5 mg/mL was the only one that presented a sensitivity of 93.3%, and did not cause any adverse reaction.

The molecule of APL that improves the diagnostic accuracy "in vitro" of allergic reactions to Amoxicillin. Studies comparing Amoxicillin and APL in the histamine release technique, which

quantifies the specific release of histamine from basophils coated with specific IgE Amoxicillin and APL. They showed a sensitivity of 78.95% and a specificity of 100% for APL, compared to a sensitivity of 63.16% and a specificity of 90% obtained for Amoxicillin.

As summarized to all results contained in this work, we can conclude that the haptenization of the molecule of Amoxicillin sodium with octa L-Lysine resulting in the molecule of APL allows: a) the obtaining of a substance of greater stability than the Amoxicillin sodium, b) this molecule has been shown to be valid for the development of a skin test with a higher predictive value in the confirmation of cases of immediate hypersensitivity to derivatives of Amoxicillin sodium, c) to have a reagent useful in the “in vitro” diagnosis, with special interest in those patients where the diagnosis “in vivo” may suppose a risk.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Las enfermedades alérgicas

Las enfermedades alérgicas en la actualidad representan uno de los principales problemas de salud en los países industrializados (Ring, 2005).

Referencias al diagnóstico y tratamiento de las mismas las encontramos en textos de las culturas hebrea y greco-romana, incluso en escritos de la antigua China, Mesopotamia e India (Tabla 1). Se han encontrado así mismo citas en la medicina árabe con respecto a la historia de la alergia y especialmente con la primera descripción de la “*fiebre rosa*”, la cual describe síntomas muy similares a la “*fiebre del heno*”. Bajo la influencia árabe, la primera universidad de medicina en Salerno era famosa por su conocido texto *Tacuinum Sanitatis*, en el que ya se puede encontrar una descripción del asma.

A lo largo del siglo XIX se establecieron las bases de la actual comprensión de estas enfermedades. Será el médico inglés John Bostock (Bostock, 1828) quién proporcione la primera descripción de la “*fiebre del heno*”. Las primeras sospechas de que el polen podía ser la causa de la “*fiebre de heno*” fueron documentadas por Wyman en el año 1872 (Wyman, 1872), quién demostró que la fiebre de heno se debía al polen de *Ambrosia artemisiifolia*. No obstante fue Blackley, en 1873 (Blackley, 1873) quién relacionó directamente la intensidad de sus síntomas con el recuento de polen atmosférico que él mismo realizaba. Aunque la alergia como concepto inmunológico no se desarrolló hasta bien entrado el siglo XX, los avances científicos que ocurrieron durante el siglo XIX, entre ellos el hito fundamental del descubrimiento de mastocitos, basófilos y eosinófilos por parte de Paul Ehrlich en 1870 (Hirsch and Hirsch, 1980), servirían para establecer la escena en la que se desarrolló el gran conocimiento de las enfermedades alérgicas durante el siglo XX.

Los hitos esenciales en materia de alergia comenzaron a comienzos del siglo XX, es en este siglo donde se llevaron a cabo la mayoría de los trabajos pioneros que han permitido comprender los mecanismos fisiopatológicos de los procesos alérgicos.

En la Tabla 1, se detalla la evolución histórica hasta 1966 en el conocimiento de la alergia.

Año	Autor/es	Avance/Descripción
~3000 a. C	Egipto	Muerte del faraón Menes por la picadura de una avispa
~900 d. C	Rhazes	Primera descripción médica de la rinitis alérgica estacional
1556	Lusitanus	Descripción de estornudos al inhalar el perfume de las rosas
1565	Botallus	Descripción del catarro o mal de las rosas
1828	Bostock	Introducción del término fiebre del heno
1860	Henry Hide Salter	Primera descripción del asma
1872	Wyman	El polen como posible causa de la fiebre del heno
1873	Blackley	Relación directa entre sintomatología alérgica y recuento de polen
1870	Paul Ehrlich	Descripción de mastocitos, eosinófilos, basófilos.
1906	Von Pirquet	Introducción del término alergia
1921	Prausnitz & Kustner	Transferencia pasiva de la sensibilidad a personas sanas mediante el suero de individuos alérgicos.
1923	Fernández-Coca	Introducción del término atopia
1966	Ishizaka et al.	Identificación de los anticuerpos IgE

Tabla 1. Hitos históricos en el conocimiento de la alergia. (Bergmann and Ring, 2014)

El término **alergia** deriva de los términos griegos “allos” y “ergon” y traducido literalmente significa “reacción extraña”. El empleo del término **alergia** se debe a Clemens von Pirquet (Von Pirquet, 1906), que lo usó por primera vez en una publicación en el periódico *Münchener Medizinische Wochenschrift*. Von Pirquet fue un joven clínico de la Universidad de Viena, que en 1906 publica su primer trabajo sobre las reacciones exageradas a las anatoxinas, donde describe las alteraciones clínicas temporales, cuantitativas o cualitativas, en relación con la capacidad de reacción del organismo y diferencia de los fenómenos inmunológicos como la inmunidad frente a patógenos o la anafilaxia, término ya descrito por Richet y Portier en 1902 en un estudio con perros en contacto con una toxina de anémona marina (Portier and Richet, 1902).

En pocos años la nueva expresión había conquistado todo el mundo y había superado en su empleo a nombres como idiosincrasia, hipersensibilidad, anafilaxia o atopia, entre otros. La palabra **alergia** representó un concepto clínico que permitió no sólo entender este tipo de situaciones clínicas, sino la génesis de las mismas, las cuales no estaban todavía en el conocimiento.

La predicción de von Pirquet de que la inmunidad y las reacciones alérgicas dependían de la interacción entre una sustancia extraña y el sistema inmune y que los mecanismos inmunológicos implicados eran similares, ha sido un tema de investigación hasta nuestros días. Así en 1921, Prausnitz y Küstner observaron que la sensibilidad a determinados alérgenos podía ser transferida a una persona sana mediante la inyección del suero de un individuo alérgico

(Prausnitz and Küstner, 1921); a este factor sérico capaz de ocasionar hipersensibilidad, se le dio el nombre de **reagina** y durante mucho tiempo la reacción de Prausnitz-Küstner fue el único método para detectar y medir la actividad reagínica del suero.

Más tarde, hacia finales de la década de los 60, los trabajos pioneros del matrimonio Ishizaka identificaron este factor reagínico como un nuevo tipo de inmunoglobulina que denominan IgE (E, de eritema) (Ishizaka and Ishizaka, 1967). En trabajos adicionales realizados con Johansson en Suecia mostraron el incremento de la misma en las parasitosis (Johansson et al., 1968), en relación con la expulsión de helmintos parásitos como *Nippostrongylus braziliensis* (Orr and Blair, 1969) y en respuesta a ciertos antígenos como la ovoalbúmina (Larsh, 1975). El descubrimiento de la IgE permitió el desarrollo de técnicas “in vitro” para medir la respuesta inmune en pacientes con alergia, desplazando la reacción de Prausnitz-Küstner debido al riesgo de transmisión de infecciones, como la hepatitis viral o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Actualmente, está admitido que la alergia atópica es una enfermedad provocada por hipersensibilidad inmediata o de tipo I, caracterizada por la producción de elevados niveles de anticuerpos IgE en suero, frente a antígenos ambientales inocuos para la mayoría de los individuos, denominados **alérgenos**. Los diferentes síntomas clínicos y tipos de alergias vienen determinados por la ruta de acceso del alérgeno al organismo: el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal, la piel y/o mediante la picadura de un insecto o la administración de medicamentos en su sentido amplio de la palabra (Kay et al., 2008). Las manifestaciones clínicas, que se pueden presentar aisladas o en combinación, incluyen desde reacciones locales, como asma alérgica, rinoconjuntivitis, sinusitis, trastornos gastrointestinales, dermatitis atópica, urticaria y angioedema, hasta reacciones sistémicas severas como el shock anafiláctico.

En la actualidad existen más de tres billones de pacientes parasitados por helmintos y de pacientes alérgicos, con un patrón común de enfermedad inflamatoria (Pulendran and Artis, 2012). Ambas condiciones, parasitación e inflamación, se encuentran encuadradas en las denominadas respuestas inmunes Tipo 2 conforme a lo preconizado por Palm en 2012 (Palm et al., 2012) en relación a las que el propio organismo genera tras la inoculación de un veneno por un animal o en el transcurso de una parasitosis. Las enfermedades alérgicas han alcanzado proporciones pandémicas y su prevalencia continúa aumentando de forma alarmante, sobre todo en los países industrializados, con un estilo de vida occidental, donde pueden llegar a afectar a más del 25% de la población (Floistrup et al., 2006). Diversos estudios epidemiológicos han observado que la etiología de las reacciones alérgicas es compleja y está influenciada por varios factores, denominados factores de riesgo (Akdis and Akdis, 2015):

I. Factores genéticos. En el genoma humano se han descrito múltiples regiones en los cromosomas 5, 6, 11, 12 y 14 que contienen genes implicados en el desarrollo y progresión de las reacciones alérgicas. A pesar de esto, la susceptibilidad genética de un determinado individuo a desarrollar algún tipo de alergia está modificada por interacciones de tipo: gen-gen, gen-medioambiente, incluso por modificaciones epigenéticas del genoma (Steinke et al., 2008).

II. Factores ambientales. La polución, los productos irritantes o el humo del tabaco, incluso la

co-exposición del alérgeno con sustancias que estimulan la inmunidad innata como determinados tipos de infecciones o la flora bacteriana, pueden aumentar el riesgo de desarrollar alergia o exacerbar los síntomas. Además, se ha descrito que el ejercicio físico o la exposición al sol pueden contribuir al cuadro clínico de la enfermedad.

III. Las características intrínsecas -estructurales y/o funcionales- del alérgeno, así como la dosis, la ruta y el tiempo de exposición al mismo.

2. Anticuerpos

2.1 Conceptos Generales

En 1890 se inicia el período de los anticuerpos tras la descripción de los mismos y de su actividad frente a enfermedades comunes como la difteria y la toxina tetánica por Emil Adolf von Behring y Shibasaburo Kitasato, quienes propusieron la teoría de la inmunidad humoral, estableciendo la existencia de un mediador en el suero sanguíneo que podría reaccionar con un antígeno extraño. Paul Ehrlich, en 1897, propuso la teoría de la cadena lateral y la interacción entre antígeno y anticuerpo, en ella describía la existencia de receptores (descritos como “cadenas laterales”) en la superficie de las células que se podrían unir específicamente a toxinas, en una interacción de tipo “llave-cerradura”. En los años 40, Linus Pauling confirmó la teoría de “llave-cerradura” propuesta por Ehrlich, demostrando que las interacciones entre anticuerpos y antígenos dependían más de su forma que de su composición química.

En 1904, Almroth Wright sugirió que los anticuerpos solubles revestían las bacterias para señalarlas para su fagocitosis y destrucción en un proceso denominado opsonización. Unos años más tarde, en 1920, Michael Heidelberger y Oswald Avery descubrieron la naturaleza de los anticuerpos, al observar que los antígenos podían ser precipitados por ellos y demostrando que éstos eran un tipo de proteínas.

A principios de la década de 1960 se produce el principal avance en este sentido, con el descubrimiento por Gerald M. Edelman y Joseph Gally de la cadena ligera, y la comprensión de que ésta era idéntica a la denominada proteína de “Bence Jones” descrita en 1845 por Henry Bence Jones. Edelman describió que los anticuerpos estaban compuestos por cadenas ligeras y pesadas unidas por enlaces disulfuro. En estudios coetáneos a éstos, Rodney Porter caracterizó las regiones de unión del anticuerpo (Fab) y la cola del anticuerpo (Fc) en el tipo IgG. Conjuntamente, estos científicos dedujeron la estructura y la secuencia completa de aminoácidos de la IgG, por lo cual recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1972.

Coetáneamente en los años 60, Thomas Tomasi descubrió los anticuerpos secretados (IgA) y David Rowe y John Fahey identifican la IgD, finalmente la IgE fue identificada por Kikishige Ishizaka y Teruki Ishizaka como una clase de anticuerpos implicados en reacciones alérgicas. En 1975, César Milstein y Georges J.F. Köhler describen el método para la producción de anticuerpos monoclonales.

2.2 Tipos y funciones de los anticuerpos

La respuesta efectora humoral se produce por las inmunoglobulinas o anticuerpos, moléculas secretadas por células plasmáticas. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, formadas por una unidad básica compuesta de dos cadenas polipépticas globulares pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) unidas entre sí por puentes disulfuro inter e intracatenarios. La Figura 1 muestra un ejemplo de inmunoglobulina.

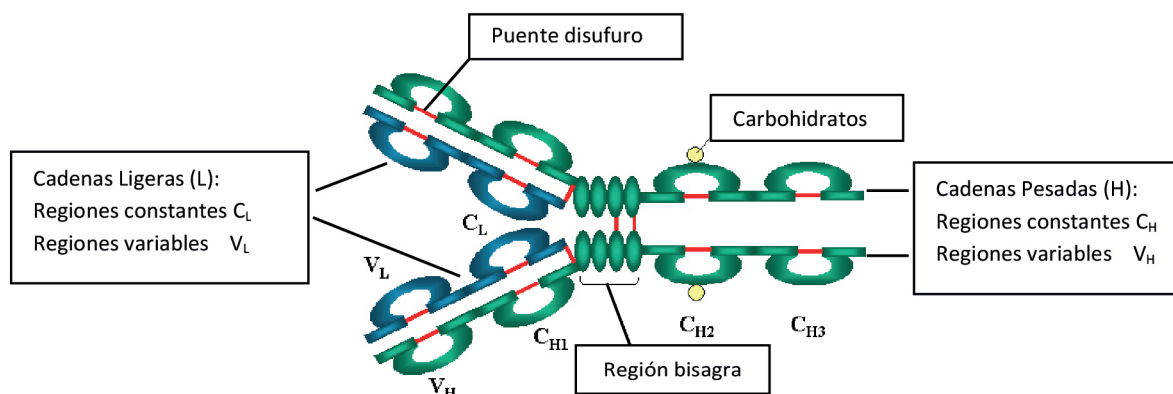


Figura 1. Molécula IgE. <http://epidemiologiamolecular.com/inmunoglobulinas/>.

La digestión por enzimas de los anticuerpos genera dos fragmentos; el fragmento Fab responsable de la unión con el antígeno y el fragmento Fc que determina las funciones biológicas en las diferentes inmunoglobulinas. El fragmento Fab está formado por una región constante y una región variable de una cadena pesada y de una cadena ligera. El fragmento Fc está formado sólo por regiones constantes de cadenas pesadas.

Las clases de inmunoglobulinas están determinadas por los diferentes isotipos de las cadenas pesadas (H):

- Inmunoglobulina M (IgM): cadena pesada mu μ .
- Inmunoglobulina G (IgG): cadena pesada gamma γ
- Inmunoglobulina A (IgA): cadena pesada alfa α .
- Inmunoglobulina D (IgD): cadena pesada delta δ .
- Inmunoglobulina E (IgE): cadena pesada épsilon ϵ .

Las cadenas ligeras pueden ser kappa κ o lambda λ . La Figura 2 muestra las estructuras de las inmunoglobulinas.

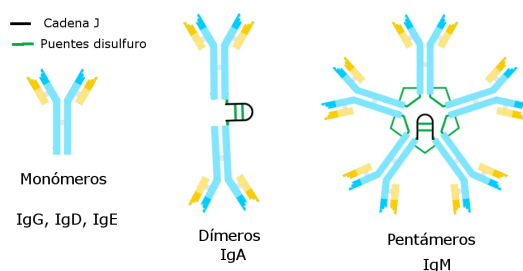


Figura 2. Estructuras de la inmunoglobulinas. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inmunoglobulinas-tipos.png>

Las distintas clases de inmunoglobulinas presentan diversas funciones biológicas:

La **IgM** representada en la Figura 3 está formada por cinco unidades básicas de inmunoglobulina unidas entre sí, y se encuentra presente en el plasma. Tiene 10 sitios de unión con el antígeno y es secretada principalmente en respuestas humorales primarias timodependientes y en respuestas timoindpendientes. Es de baja afinidad pero presenta gran avidéz por antígenos multivalentes especialmente bacterianos. Es una potente fijadora del complemento, al presentar cinco fragmentos Fc que unen al factor del complemento C1q. La IgM se encuentra en la membrana de linfocitos B en forma de monómero, constituyendo los receptores idiotípicos de estas células.

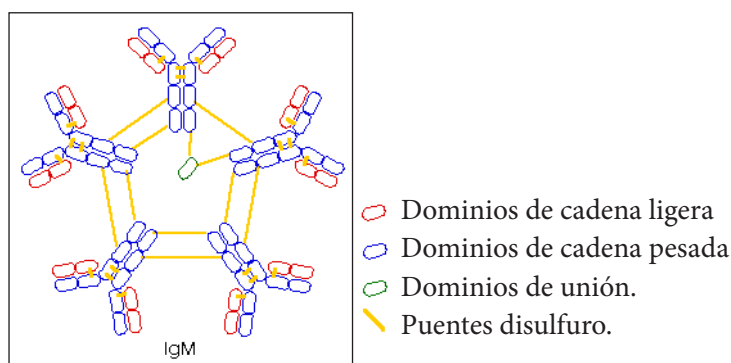


Figura 3. Inmunoglobulina M. <http://uhaweb.hartford.edu/BUGL/immune.htm>.

La **IgG**, representada en la Figura 4 es la inmunoglobulina más abundante en el plasma, es monomérica y producida en grandes cantidades durante respuestas secundarias a antígenos timodependientes. Esta inmunoglobulina atraviesa la placenta confiriendo protección al feto durante el embarazo. Sus principales funciones biológicas incluyen fijación del complemento, unión a receptores para Fc en células fagocíticas al opsonizar partículas durante la fagocitosis y unión a receptores en células NK durante la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC).

La **IgD**, representada en la Figura 4 es una inmunoglobulina unida a membrana de los linfocitos B. Su presencia en conjunto con IgM confiere inmunocompetencia a estos linfocitos. Está prácticamente ausente en el suero.

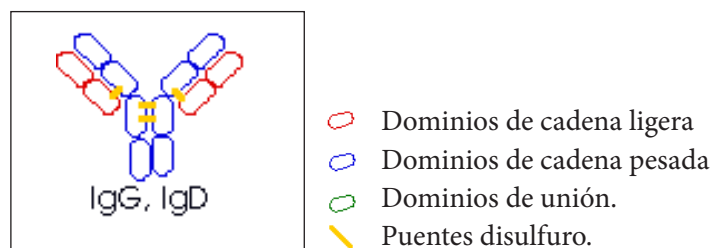


Figura 4. Inmunoglobulina G y D. <https://uhaweb.hartford.edu/BUGL/immune.htm>.

La **IgA**, representada en la Figura 5 se encuentra en lágrimas, leche, saliva y mucosa de los tractos digestivos. Está formada por dos unidades básicas unidas por una pieza secretora sintetizada por las células epiteliales de las mucosas. Esta pieza secretora es un polipéptido responsable del transporte de la IgA a través del epitelio que además la protege de la acción de enzimas proteolíticas presentes en las secreciones. No fija complemento ni es opsonina. Su función es impedir la infección por parte de microorganismos y macromoléculas al organismo.

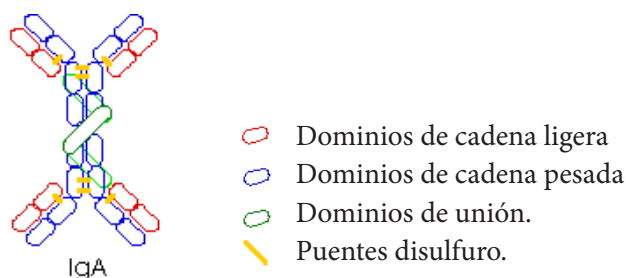


Figura 5. Inmunoglobulina A. <https://uhaweb.hartford.edu/BUGL/immune.htm>.

La **IgE**, es la principal molécula involucrada en la hipersensibilidad inmediata (Wills- Karp et al., 2001). Su concentración sérica es entre 10.000 y 100.000 veces menor que la que presentan la Ig A y la Ig G respectivamente, estableciéndose entre los 17 y los 450 ng/mL. Representa el 0,002% del total de las inmunoglobulinas. La Ig E tiene una vida media muy corta, entre 2 y 3 días, sin embargo, una vez que se fija a los mastocitos, basófilos o a las células de Langerhans, su vida media se incrementa en varias semanas. La capacidad de fijación del complemento a la Ig E es muy limitada, y si se realiza, se hace mayoritariamente por la vía clásica, aunque existen evidencias que con determinados antígenos puede utilizar la vía alternativa.

Presenta una estructura monomérica, y al igual que todas las inmunoglobulinas, se encuentra formada por dos cadenas pesadas (ϵ) con un total de 5 dominios de inmunoglobulina, y dos cadenas ligeras (κ ó λ) que contiene cada una 2 dominios de inmunoglobulina. Los enlaces disulfuro se unen covalentemente con las cadenas ligeras y pesadas y forman una estructura tetramérica. Las cadenas pesadas o "H" (ϵ) con un peso molecular aproximado entre 50 y 75 kDa y las cadenas ligeras o "L" (κ ó λ) con un peso molecular de unos 25 kDa (Holgate et al., 2012)

Los receptores para la IgE han sido identificados y clasificados en tres tipos: FcεRI, FcεRII y εBP, cuya distribución se expresa en la Tabla 2:

Receptores IgE	Denominación	Composición	Tipo de Unión	Tipos Celulares
FcεRI	Receptor de alta afinidad	Cuatro cadenas polipeptídicas	La cadena se une a εCH3	Mastocitos Basófilos C. Langerhans
FcεRII: α ó β	CD 23	Proteína de membrana de 30 KDa relacionada con la familia de las Lectina C de mamíferos.	Se une a CH2-4	CD23a, células B CD23b a monocitos y eosinófilos
εBP	Galectina 3	Lectina de 35 Kda. Es citoplasmática.	Se une a la cadena ε por los restos de los carbohidratos y origina glicoformas.	Mastocitos Macrófagos Neutrófilos Eosinófilos C. Langerhans

Tabla 2. Receptores para la IgE.

La IgE presenta un peso molecular de 180 kDa y un coeficiente de sedimentación de 8 S, siendo por tanto la inmunoglobulina monomérica más pesada y que responde a la forma molecular $\epsilon^2\lambda_2$ ó $\epsilon^2\kappa_2$. Su función biológica más importante es la de encontrarse asociada a la protección de lugares anatómicos susceptibles de sufrir traumatismos, así como en relación con la protección contra el ingreso de patógenos, que ejerce mediante el reclutamiento local de factores plasmáticos y células efectoras, desencadenando una reacción inflamatoria aguda.

La síntesis de la IgE depende exclusivamente de las células T helper CD4+ y concretamente de la subpoblación de células Th₂, así como de la secreción de citoquinas IL 4, IL 5 e IL 13 (Abbas et al., 1991).

La IgE Figura 6, se fija a través del receptor de alta afinidad FcεRI del mastocito en las superficies mucosas cuando es inyectada en la piel del ser humano.

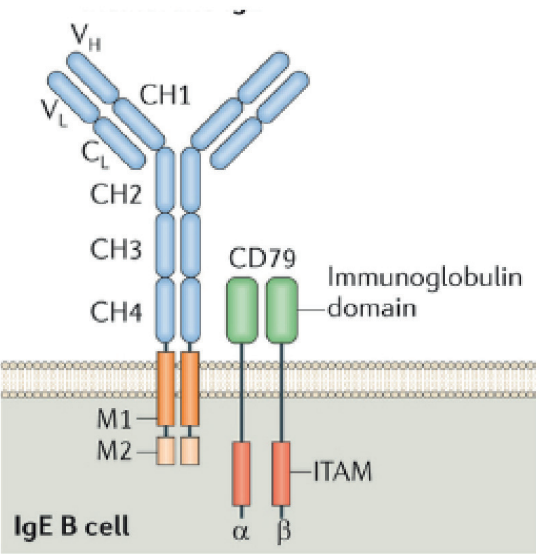


Figura 6. Esquema de la IgE de membrana. (Wu and Zarrin, 2014)

3. Hipersensibilidad inmediata

El término hipersensibilidad define aquellos trastornos de la salud originados por una respuesta inmune. Hay varios factores que pueden desencadenar respuestas de hipersensibilidad, como:

- Enfermedades autoinmunes donde los anticuerpos del individuo responden frente a antígenos propios, presentes en el organismo.
- Respuestas exacerbadas frente a patógenos externos, que pueden derivar en inflamaciones crónicas de tejidos e incluso en granulomas.
- Reacciones de hipersensibilidad frente a antígenos ambientales, en las que un porcentaje de la población responde de manera anómala frente a sustancias ambientales inocuas, produciendo anticuerpos específicos frente a esos antígenos del tipo IgE.

Estas últimas, son las reacciones englobadas dentro de la enfermedad alérgica, sobre las que vamos a profundizar con más detalle.

Las respuestas de hipersensibilidad frente a antígenos ambientales denominados alérgenos son mediadas por inmunoglobulinas del tipo E, se denominan reacciones de hipersensibilidad inmediata, caracterizándose por una activación de linfocitos T cooperadores, del tipo Th₂, productores de IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulan la producción de anticuerpos IgE y promueven la inflamación.

La hipersensibilidad inmediata se compone de dos fases, una fase de sensibilización en la que se produce un primer contacto con el alérgeno, dando lugar a la activación de linfocitos específicos frente al alérgeno, la producción de IgE alérgeno específica y la unión del anticuerpo a receptores para la Fc de los mastocitos y basófilos. En una segunda fase denominada fase efectora, se produce la activación de los mastocitos y basófilos por reexposición al alérgeno, provocando la secreción del contenido preformado en los gránulos de mastocitos y basófilos y la síntesis y secreción, incluso de novo, de mediadores lipídicos y citoquinas, que en su conjunto se conocen como mediadores de la reacción de hipersensibilidad inmediata o tipo I.

Esta cascada de mediadores produce las reacciones fisiológicas típicas de una reacción alérgica como vasodilatación, broncoconstricción, hipermotilidad intestinal, inflamación y daño tisular, surgiendo las manifestaciones clínicas como aumento de la mucosidad, exantemas y otras alteraciones dermatológicas, rinitis, conjuntivitis y asma. En la Figura 7 se recoge el esquema de la fase de sensibilización y la fase efectora.

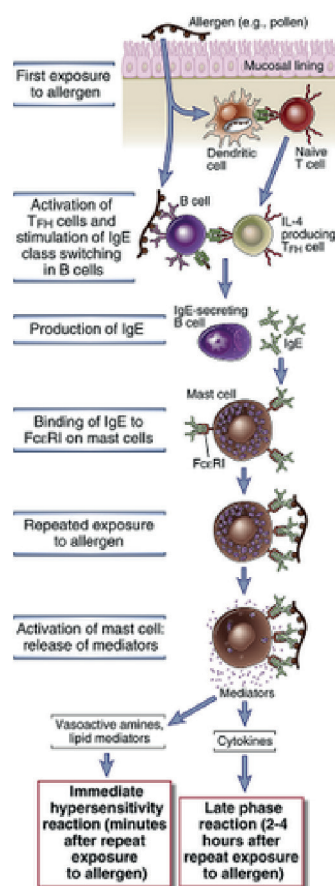


Figura 7. Esquema de la fase de desensibilización. (Abbas et al., 2015)

3.1 Mastocitos

Los mastocitos, también conocidos como células cebadas, derivan de progenitores presentes en la médula ósea (Costa et al., 1997), que a través de la circulación migran a los tejidos periféricos como células inmaduras y se diferencian *in situ*. Se encuentran preferentemente cerca de los vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, por debajo del epitelio, así como en órganos linfoides. Microscópicamente presentan una variedad de formas, siendo común el núcleo redondeado y la presencia de abundantes gránulos citoplasmáticos, que contienen proteoglicanos ácidos, estando los mismos limitados por una membrana y cuerpos lipídicos. Se han descrito dos subpoblaciones de mastocitos (Irani et al., 1986; Weidner and Austen, 1990), del tejido conjuntivo o tipo 1 y mucosos o tipo 2, que se diferencian por la localización anatómica, el contenido de sus gránulos y las diferentes acciones de los mediadores.

En la Tabla 3, se recoge las subpoblaciones de mastocitos humanos.

Mastocitos	Subtipo 1	Subtipo 2
Características	Tejido conjuntivo	Mucosos
Localización	Piel Submucosa intestinal	Espacios alveolares Mucosa intestinal
Dependencia en el desarrollo del fenotipo de células T	No	Sí
Contenido gránulos	Proteasas neutras; Tryptasa, Cathepsina G, Quimasa, Carboxipeptidasa	Proteasa mayor; Tryptasa

Tabla 3. Tipos y localización de mastocitos.

3.2 Basófilos

Son granulocitos sanguíneos con muchas similitudes estructurales y funcionales con los mastocitos. Derivan de la médula ósea, aunque de una línea diferente a mastocitos, donde pasan a sangre. Representan menos del 1% del total de leucocitos sanguíneos circulantes, y aunque normalmente no están presentes en los tejidos pueden ser reclutados en algunas zonas inflamatorias. Al igual que los mastocitos, su citoplasma contiene gránulos que fijan colorantes básicos y presentan la capacidad de sintetizar mediadores similares a los presentes en mastocitos. Su rasgo más importante es el de expresar el receptor FcεRI y su posterior reclutamiento en los tejidos en los que esté presente el antígeno, pudiendo contribuir al desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad inmediata.

3.3 Activación de mastocitos y basófilos

La activación de mastocitos y basófilos, por entrecruzamiento de IgE–antígeno, vía señalamiento a través del receptor de alta afinidad FcεRI (Baird et al., 1999), conduce a tres tipos de respuesta biológica dependiente de los mediadores liberados y formados de novo:

- Secreción del contenido de los gránulos citoplasmáticos mediante exocitosis
- Síntesis y secreción de mediadores lipídicos.
- Síntesis y secreción de citoquinas.

Este proceso de entrecruzamiento se induce mediante la unión de antígenos multivalentes a las moléculas de IgE fijadas a sus receptores. Así, en los individuos no atópicos, la IgE asociada al mastocito o basófilo es específica para muchos antígenos diferentes, siendo difícil que un antígeno aislado entrecruce suficientes moléculas de IgE para inducir la activación de la célula.

Mientras que los individuos atópicos presentan una mayor probabilidad de entrecruzamiento entre moléculas de IgE. Experimentalmente, la unión al antígeno puede reproducirse empleando anticuerpos anti FcεRI ó anti IgE polivalentes. Los anticuerpos anti IgE pueden entrecruzar moléculas de IgE con independencia de la especificidad del antígeno y dar lugar a una activación

comparable de los mastocitos o basófilos en individuos atópicos y no atópicos.

3.3.1 Mediadores derivados de mastocitos y basófilos

Las funciones efectoras de los mastocitos y basófilos están mediadas por moléculas solubles liberadas desde las células activadas. Estos mediadores pueden dividirse en *mediadores preformados*, aquellos que conforman parte de la célula (mastocitos y basófilos) antes de la reacción de hipersensibilidad (entre estas sustancias se encuentran las aminas biógenas y las macromoléculas del gránulo) y *mediadores sintetizados ante la reacción de hipersensibilidad*, entre los que están los mediadores lipídicos y las citoquinas.

En la Figura 8, se muestra un esquema de los mediadores liberados por los mastocitos y basófilos y sus principales efectos biológicos.

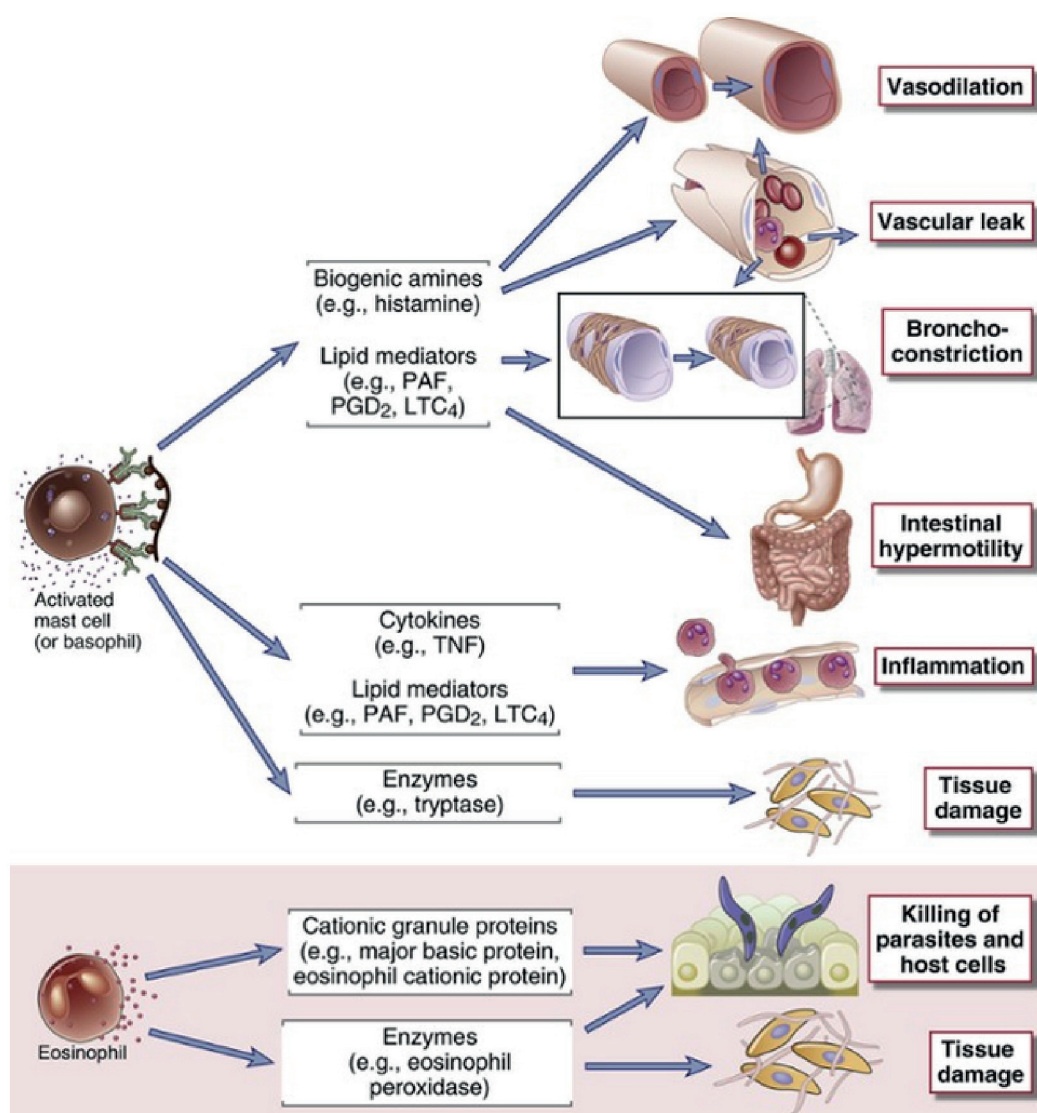


Figura 8. Esquema de mediadores liberados por mastocitos y basófilos y efectos fisiológicos provocados. (Abbas et al, 2015)

3.3.1.1 Mediadores preformados

Las *aminas biógenas*, son compuestos de bajo peso molecular y naturaleza no lipídica que comparten la característica estructural de poseer un grupo amino. En los mastocitos humanos el único mediador de esta clase presente en cantidades significativas es la histamina (Huang and Thurmond, 2008) mientras que en algunos roedores la serotonina puede llegar a tener la misma importancia que la histamina en humanos (Abraham and Arock, 1998). La histamina realiza su acción biológica mediante su unión a receptores específicos presentes en las células diana y de los que se conocen en la actualidad 4 tipos, denominados como H1, H2, H3 y H4. Tras su unión al receptor celular, se induce una cascada de señalización intracelular que conduce a la escisión del fosfatidilinositol en inositol trifostato (IP3) y diacilglicerol (DAG), induciendo distintos efectos de corta duración en los diferentes tipos de células diana. En la Tabla 4, se muestran los efectos biológicos de la histamina.

Células Diana	Efecto Inducido
Endotelio	Contracción célula endotelial y extravasación vascular. Síntesis de relajantes de musculatura lisa vascular (PGI2) y óxido nítrico, que inducen vasodilatación.
Músculo liso	Bronquios: broncoconstricción. Intestino: hipermotilidad.

Tabla 4. Principales efectos biológicos de la histamina.

Las **proteasas**, forman parte de las macromoléculas del gránulo. Son de naturaleza proteica, están integradas por peptidasas pertenecientes a la clase de las serin proteasas neutras, siendo las más abundantes la triptasa y la quimasa. La presencia de triptasa (Shakoory et al., 2004) en fluidos biológicos se considera como marcador de activación mastocitaria, dado que sólo ha podido demostrarse en humanos, si bien en basófilos se ha encontrado aunque en mínimos porcentajes (<1%). Su función biológica, demostrada exclusivamente “in vitro”, está relacionada con la escisión del fibrinógeno y la activación de la collagenasa; lo que podría explicar su contribución a la lesión tisular. La quimasa, es también un marcador de discriminación entre subpoblaciones mastocitarias humanas. Análogamente su función biológica, demostrada “in vitro”, se encuentra relacionada con la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, lo que podría relacionarse con la degradación de la membrana basal epidérmica y la estimulación de la secreción de moco. Otras peptidasas implicadas son la carboxipeptidasa A y catepsina G.

El tercer grupo de mediadores preformados lo integran los proteoglicanos, moléculas que poseen un núcleo polipeptídico y múltiples cadenas laterales no ramificadas de glucosaminoglicanos, que confieren una fuerte electronegatividad a la molécula. La heparina y el condroitin sulfato (Stevens and Adachi, 2007) son los más abundantes. Actúan como matriz de almacenamiento de aminas biogénas, enzimas y otras moléculas con carga positiva. Su función se encuentra asociada a la regulación de la actividad de las serin proteasas almacenadas en los gránulos y por tanto de su accesibilidad al resto de la estructura celular.

Las **citoquinas**, son moléculas de señalización extracelular que se unen a receptores específicos de la superficie celular para regular la respuesta inmune e inflamatoria. Hasta la fecha, se han descrito más de 70 citoquinas. En el proceso de inflamación que se produce como consecuencia de una reacción alérgica las citoquinas están activas en la médula ósea, donde regulan el desarrollo y diferenciación de las células inflamatorias (por ejemplo la IL-5 induce la proliferación de eosinófilos), como también están presentes en los tejidos inflamados (por ejemplo en las vías respiratorias bajas, produciendo asma) donde regulan la respuesta inflamatoria. Dependiendo del perfil de citoquinas expresado por el individuo la reacción puede ser pro-inflamatoria o anti-inflamatoria.

Las citoquinas conforman, una importante actividad en relación con la regulación local del crecimiento y diferenciación de los mastocitos. Los basófilos representan también una importante fuente de citoquinas como la IL-4 y la IL-13, citoquinas implicadas en la síntesis de IgE (Kobayashi et al., 2000), así como de otras citoquinas en relación con el desarrollo del fenómeno inflamatorio como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Anthony et al., 2007).

3.3.1.2 Mediadores de nueva síntesis

Los mediadores de nueva síntesis son compuestos de naturaleza lipídica sintetizados de novo tras la activación de mastocitos y basófilos. Los mediadores más importantes son los derivados del metabolismo del ácido araquidónico. El ácido araquidónico, es un ácido graso C20:4 originado a partir de los fosfolípidos de la membrana de los mastocitos. Puede liberarse de la misma por la acción de la fosfolipasa A₂ o por la acción conjunta de la fosfolipasa C y la diacilglicerol lipasa. A partir del ácido araquidónico se generan más de 20 productos, a través de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa.

El principal mediador derivado del ácido araquidónico es la **prostaglandina D2 (PGD2)**, la cual es inducida por la acción de la ciclooxigenasa de los mastocitos. La PGD2 actúa uniéndose a sus receptores específicos presentes en las células musculares lisas, ejerciendo una acción broncoconstrictora y vasodilatadora, así como quimiotractante para los neutrófilos, que se acumulan en el foco de la inflamación. Su síntesis puede ser bloqueada mediante inhibidores de la ciclooxigenasa, como el ácido acetilsalicílico y otros antiinflamatorios no esteroideos.

Los mediadores derivados del ácido araquidónico inducidos por la vía de la lipooxigenasa, en mastocitos y basófilos, son los leucotrienos, especialmente el LTC₄ y sus productos de degradación LTD₄ y LTE₄. El LTC₄ es sintetizado por mastocitos mucosos y basófilos, pero no por los mastocitos del tejido conjuntivo. Este tipo de leucotrienos presentan receptores específicos en las células de la musculatura lisa, induciendo una broncoconstricción prolongada (Mc Fadden and Gilbert, 1992).

En la Figura 9, podemos ver un esquema de los mediadores de nueva síntesis.

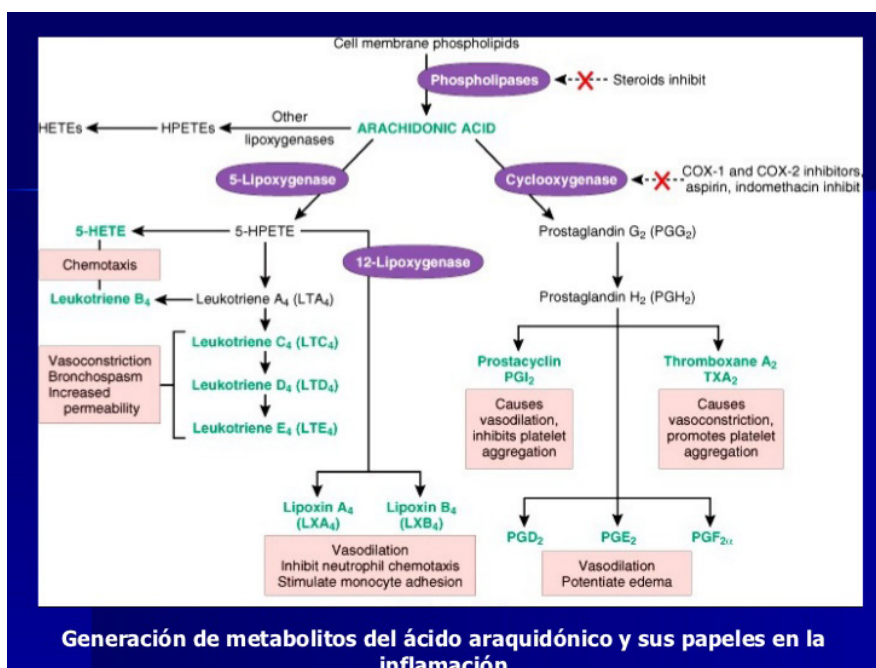


Figura 9. Metabolismo del ácido araquidónico. (Kumar et al., 2007)

Otro de los principales mediadores lipídicos producidos por los mastocitos es el denominado **factor activador de las plaquetas (PAF)**, que debe su nombre a su característica descrita inicialmente de inducir la agregación plaquetaria en el conejo. El PAF en los mastocitos y basófilos se sintetiza a partir de la acilación del lisogliceril éter de fosforilcolina, un derivado de la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, mediado por la actuación del enzima fosfolipasa A₂ (PLA₂). Sus principales efectos biológicos son la broncoconstricción directa y la retracción de las células del endotelio, que conduce a la relajación de la musculatura lisa vascular, así como también la acumulación de leucocitos inflamatorios (Frinkelman et al., 2005). Su mecanismo de acción está relacionado con la activación de la vía de ciclooxigenasa II (inducible) y su consiguiente mecanismo de retroalimentación. La elevada hidrofobicidad del PAF le confiere una elevada metabolización a partir del enzima plasmático PAF acetil hidrolasa. La principal fuente de producción de PAF parece asignarse a los basófilos así como también a las células del endotelio vascular, que lo liberan una vez que la histamina o los leucotrienos los estimulan.

3.4 Eosinófilos

Son granulocitos sanguíneos, provenientes de medula ósea, que expresan gránulos citoplasmáticos que contienen enzimas lesivas para las paredes celulares de los organismos invasores, pero que también pueden dañar tejidos del anfitrión. Los eosinófilos contienen proteínas básicas que se tiñen con pigmentos ácidos como la eosina.

Este tipo celular, abundante en los infiltrados inflamatorios de fase tardía, circula en sangre diferenciándose por la acción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos GM-CSF y las IL-3 e IL-5.

Su presencia es habitual en los tejidos periféricos y en especial en los revestimientos mucosos de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario. Su activación y reclutamiento hacia las zonas de inflamación en las reacciones de fase tardía es mediada por las citoquinas producidas por las subpoblaciones Th₂, lo cual contrasta con las reacciones de hipersensibilidad retardada o celular, que están mediadas por la subpoblación Th₁ y en las que intervienen la activación de los macrófagos. Los principales factores discriminatorios de ambas reacciones son la presencia de macrófagos en los infiltrados inflamatorios y las subpoblaciones celulares Th₁ y Th₂ (Constant et al., 2000).

La activación de los eosinófilos depende fundamentalmente de las mismas citoquinas que intervienen en su maduración y principalmente de la IL-5, que los transforma a una forma hipodensa e incrementa su tamaño con respecto a su forma habitual. Su reclutamiento e infiltración en el endotelio viene definido por la expresión en las células endoteliales de la Selectina-E, receptor específico de los eosinófilos para fijar la mucosa a sus tejidos, a la cual se unen al igual que los neutrófilos.

Sin embargo, y a diferencia de éstos, los eosinófilos expresan VLA-4 (CD49dCD29) y también se adhieren a las células endoteliales que expresan la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1). La IL-4 es capaz de inducir la expresión de VCAM-1 en células endoteliales sin inducir la expresión de la selectina-E. Por lo tanto, los focos inflamatorios ricos en células TH₂ productoras de IL-4 y de IL-5 o basófilos atraerán eficazmente a los eosinófilos.

Los eosinófilos expresan receptores de Fc para la IgG, IgA e IgE, aún cuando no parecen ser sensibles a la activación por entrecruzamiento entre receptores mediada por el antígeno (Kinet, 1999). Sus gránulos contienen hidrolasas lisosómicas, como la peroxidasa, que cataliza la producción de ácido hipocloroso y proteínas específicas como la catiónica (ECP) y la principal básica (BPP); ambas especialmente tóxicas para helmintos y bacterias, así como para los tejidos circundantes. Los eosinófilos en su forma activada producen y liberan mediadores lipídicos con propiedades antiinflamatorias, muchos de los cuales poseen propiedades vasoactivas que incrementan los efectos biológicos de los mediadores producidos por los mastocitos y basófilos. Su producción por vía 5 y 15 lipooxigenasa, conduce a la producción del LTC₄ y sus derivados LTD₄ y LTE₄, potentes estimuladores de la actividad vasomotora, bronconstricción y secreción de moco. También han sido descritos mediadores como PAF y citoquinas, entre las que se encuentran la IL-1β, IL-3-4-5-6-10, GM-CSF, MIP-1α, TNF-α, RANTES y la eotaxina, aun cuando no se conocen sus funciones biológicas (Wardlaw et al., 1995).

3.5 Mecanismos de la reacción alérgica

Los mecanismos que subyacen a la hipersensibilidad inmediata o de tipo I, tal y como fue clasificada por Gell y Coombs en 1963 (Gell and Coombs, 1963), pueden ser divididos en dos etapas principales. Una primera fase de sensibilización y desarrollo de memoria celular, seguida por la fase efectora, la cual a su vez se subdivide en respuesta inmediata y respuesta tardía. La Figura 10 muestra un esquema del mecanismo de la reacción alérgica.

Fase de sensibilización y desarrollo de memoria celular

Durante la sensibilización, el alérgeno entra en contacto con la superficie de las mucosas donde es capturado y procesado por las células presentadoras de antígeno (APCs) profesionales, principalmente las células dendríticas (DCs) (Hammad and Lambrecht, 2008). Seguidamente, las DCs migran a la zona T de los ganglios linfáticos y presentan los péptidos derivados del alérgeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (en ratón, MHC-II y en humanos, HLA-II) a las células T CD4+ (Th0), que expresan los receptores de células T (TCRs) específicos para dicho complejo, activándolas y provocando su diferenciación.

Dependiendo de la capacidad de las sustancias co-expuestas con el alérgeno para activar una respuesta inmune innata, las señales para la diferenciación celular, el estado de la célula y las citoquinas presentes en el microentorno, las células Th0 se pueden diferenciar en; Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22. (Akdis and Akdis, 2011).

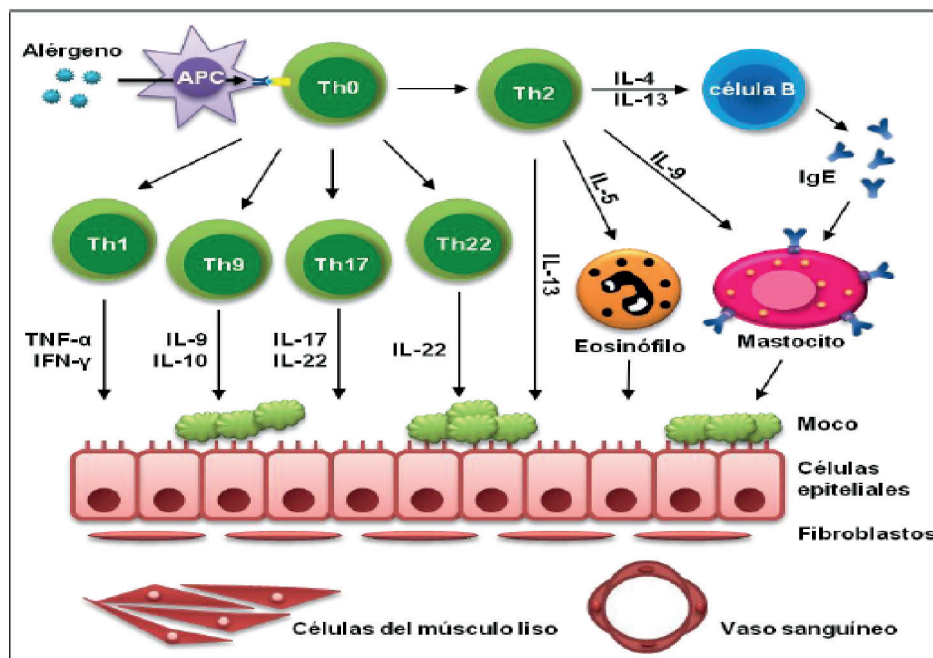


Figura 10. Mecanismo de la reacción alérgica. (Adaptado de Holgate and Polosa, 2008)

En el caso de las reacciones alérgicas se produce la diferenciación y expansión clonal de las células Th2 específicas del alérgeno, las cuales son responsables de la inmunopatología y de la clínica de la enfermedad. Estas células producen diversas interleuquinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como otras citoquinas identificadas recientemente, como IL-25, IL-31 e IL-33 (Akdis and Akdis, 2011). Estas citoquinas están implicadas en diferentes funciones como: el cambio de isotipo de IgM a IgE en las células B (IL-4 e IL-13), las cuales se activan y diferencian a células plasmáticas, el reclutamiento de mastocitos (IL-4, IL-9 e IL-13) y la maduración de eosinófilos (IL-3, IL-5 y GM-CSF) y basófilos (IL-3 e IL-4) (Holgate and Polosa, 2008). Además, en esta etapa se establece un repertorio de células B y T de memoria específica del alérgeno, así como su expansión clonal.

Los anticuerpos IgE circulantes se unen a receptores de IgE de alta afinidad (Fc ϵ RI) presentes en la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos), formando complejos IgE-Fc ϵ RI lo que provoca la sensibilización de los pacientes a un determinado alérgeno (Kalesnikoff and Galli, 2008; Simons, 2010). Los anticuerpos IgE presentes en el suero tienen una vida media corta (2 días) en comparación con otros anticuerpos, como la IgG (21-23 días), pero una vez que son secuestrados por el Fc ϵ RI su vida media aumenta hasta los 10 días.

Fase efectora

Respuesta inmediata

Tiene lugar una vez que el individuo, previamente sensibilizado, contacta de nuevo con el alérgeno, el cual se une a los complejos IgE- Fc ϵ RI presentes en la superficie de las células efectoras. Esta unión provoca el entrecruzamiento de los complejos, activándose una cascada de señalización que deriva en la desgranulación de las células, con la consiguiente liberación al entorno de sustancias anafilactogénicas, además de producirse una síntesis rápida de nuevos mediadores. Entre estas sustancias liberadas se encuentran: aminas vasoactivas (p.ej, histamina), mediadores lipídicos (p.ej, prostaglandinas D y leucotrienos), ligandos de receptores de quimioquinas CXC (p.ej, CXCL8 y CXCL10) y de quimioquinas CC (p.ej, CCL2, CCL4 y CCL5), y otras citoquinas (p.ej, IL-4, IL-5 e IL-13). Todas estas moléculas son las responsables de los síntomas clínicos que caracterizan la fase inmediata de la reacción alérgica, los cuales se manifiestan durante los 30 primeros minutos desde el contacto con el alérgeno (Kalesnikoff and Galli, 2008; Simons, 2010).

Las IgE específicas del alérgeno también se unen a Fc ϵ RI de la superficie de DCs y monocitos, así como a receptores de IgE de baja afinidad (Fc ϵ RII o CD23) presentes en la superficie de células B. Este proceso incrementa la captura del alérgeno por estas APCs y la posterior presentación de los péptidos derivados del alérgeno a las células Th2 específicas, factores ambos que contribuyen a la iniciación de la respuesta tardía de la reacción alérgica.

Respuesta tardía

Las quimioquinas liberadas durante la respuesta inmediata por las células efectoras dirigen el reclutamiento de mastocitos, basófilos, eosinófilos y células Th2 específica a los sitios de entrada del alérgeno, lo que deriva en una inflamación local. Los mastocitos y basófilos activados liberan histamina, quimioquinas y citoquinas, mientras que las células Th2 específicas se reactivan y expanden clonalmente. Éstas últimas producen grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, citoquinas implicadas en el mantenimiento de unos niveles elevados de IgE específica, la diferenciación de mastocitos, la hipersecreción de moco, la contracción de la musculatura lisa y el desarrollo e influxo de células inflamatorias a los tejidos inflamados (Akkoc et al., 2011).

Los eosinófilos –las células inflamatorias más importantes de la respuesta tardía- requieren IL-5, GM-CSF y eotaxina para su reclutamiento, maduración y supervivencia. Estas células liberan un gran número de mediadores proinflamatorios, incluyendo proteínas básicas (proteína catiónica,

peroxidasa eosinofílica, proteína básica mayor y neurotoxina derivada del eosinófilo), citoquinas (IL-3, IL-5 e IL-13), mediadores lipídicos (p.ej, leucotrienos) y óxido nítrico. Dichas sustancias contribuyen al daño tisular, la inflamación bronquial, la producción de moco y la hiperreactividad de las vías aéreas (Akdis and Akdis, 2011). A medida que la inflamación progresa se produce hiperplasia de las células epiteliales y remodelación de las vías aéreas.

Inicialmente la respuesta alérgica se explicaba, fundamentalmente, debido a un desequilibrio entre las células Th1 y las Th2. Hoy en día se sabe que las células Th1 desarrollan funciones importantes en la inmunopatología de las reacciones alérgicas, así como otros subtipos de células T CD4+, como las células Th9, Th17 y Th22 (Sallusto and Lanzavecchia, 2009). Estas células pueden promover diferentes tipos de respuestas inflamatorias en función de su perfil de citoquinas, respuesta a quimioquinas e interacción con otros tipos celulares.

4. Antibióticos

Desde la introducción de los antibióticos en la práctica clínica en la década de los años 1940, éstos se han convertido en medicamentos indispensables para el tratamiento de la mayoría de los procesos infecciosos bacterianos, tanto en el hombre como en los animales (Armstrong and Conn, 1999).

Existen grandes diferencias en las tasas de consumo de antibióticos entre distintos países. En salud humana, según un estudio del “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC 2013), se estima que, en un día cualquiera en torno al 30% de los pacientes ingresados en los hospitales europeos recibe al menos un antibiótico. Este estudio muestra que España se encuentra por encima de la media europea, con unas cifras estimadas del 46% lo que nos sitúa en quinta posición en cuanto al consumo de antibióticos en Europa a nivel hospitalario.

La Figura 11 muestra la prevalencia del uso de antibióticos en los hospitales europeos.

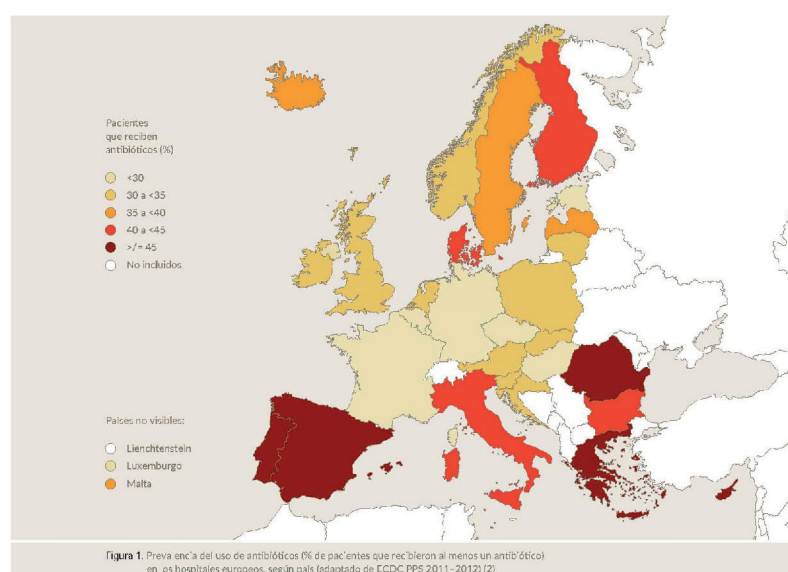


Figura 11. Prevalencia del uso de antibióticos. www.aemps.gob.es

Por otro lado, el 90% del consumo de antibióticos se produce en atención primaria (Palop et al., 2003), donde una tercera parte de las consultas está relacionadas con enfermedades infecciosas y, de ellas, algo más de la mitad están relacionadas con infecciones del tracto respiratorio (Llor and Hernández, 2010).

Un informe de la OCDE mostró que España tenía cifras relativamente similares al resto de países de la OCDE en cuanto al volumen prescrito de antibióticos. Sin embargo, esto no ocurría en la prescripción de cefalosporinas y quinolonas, donde España superaba al resto de países de la OCDE (2013).

El uso de antibióticos parece, por tanto, excesivo y frecuentemente inadecuado tanto en atención primaria como en la atención hospitalaria. En salud humana, la instauración de tratamientos inadecuados acontece en porcentajes cercanos o superiores al 50% del uso de los antibióticos, tanto en el ámbito hospitalario como en atención primaria. (Dellit et al., 2007).

Los antibióticos β -lactámicos representan la terapéutica de elección de la mayoría de las infecciones bacterianas, si bien su empleo se encuentra limitado por dos factores claves:

- Las resistencias
- Las reacciones alérgicas

Los antibióticos β -lactámicos se caracterizan químicamente por la presencia de un anillo β -lactámico que determina sus características más importantes; mecanismo de acción, principal mecanismo de resistencia y escasa toxicidad directa.

Se denomina β -lactámico a un heterociclo de cuatro átomos que tiene un oxígeno en posición β con relación al nitrógeno de la lactama ($O=C-N-$) (Budavari, 1996). El anillo β -lactámico es esencial para la actuación de estos antimicrobianos, pero aislado carece de actividad antimicrobiana y necesita ser activado por otros radicales para unirse a las dianas donde ejerce su acción (proteínas fijadoras de penicilinas, PBP) (Neuhaus and Georgopapadakou, 1992).

La naturaleza de los radicales esenciales que se unen al anillo β -lactámico define las diferentes clases de antibióticos β -lactámicos. Lo habitual es que sean anillos heterocíclicos, es decir, formados por distintos átomos, y que estén fusionados o condensados al anillo β -lactámico por el nitrógeno 1 y el carbono 4. Los anillos estructurales más frecuentes son dobles: el anillo β -lactámico (anillo primario) y otro en combinación (anillo secundario). De los anillos secundarios depende, en parte, la actividad, la resistencia a las betalactamasas y las características farmacocinéticas. Estos esqueletos básicos pueden unir diferentes cadenas laterales lineales o cíclicas en las distintas posiciones que admiten sustitución química, estas cadenas laterales complementan, a veces de forma muy importante, las características antimicrobianas (espectro, actividad y resistencia a betalactamasas) y farmacocinéticas definidas por los anillos básicos y son las causantes de los efectos adversos individuales.

De todos estos datos, se deduce que el número de antibióticos, grupos o tipos de β -lactámicos

puede ser muy elevado. La nomenclatura de los β -lactámicos, detallada a continuación, ha sido revisada por Brown (Brown, 1982).

1. B-lactamas o antibióticos β -lactámicos monocíclicos; sólo poseen el anillo β -lactámico, que no está fusionado a ningún anillo secundario. Son las denominadas monobactámicos, un ejemplo es el *aztreonam*.

2. Penamas; son β -lactámicos bicíclicos (4:5) en que el anillo β -lactámico está fusionado a uno tiazolidínico. Incluyen Penicilinas, 6- α -metoxipenicilinas y sulfonas del ácido penicilánico. En este grupo también podemos incluir las carboxipenamas. Habitualmente en todas las penamas, los hidrógenos del carbono 2 se han sustituido por radicales metilo. Dentro de las Penicilinas podemos hablar de diversos tipos: Penicilinas naturales (*penicilina G*, *penicilina V*); Penicilinas resistentes a la penicilinas (*meticilina*, *naftcilina*, *dicloxacilina*); Penicilinas de amplio espectro (*carbenicilina*, *ticarcilina*, *mezlocilina*, *azlocilina*, *piperacilina*); Aminopenicilinas (*ampicilina*, *amoxicilina*).

3. Penemas; El anillo penemo tiene un doble enlace entre C_2 y C_3 , está constituido por un anillo β -lactámico fusionado a uno dihidrotiazolínico.

4. Carbapenemas o carbapenémicos; El núcleo carbapenemas está formado por el anillo penemo, del que difiere en que posee un átomo de carbono (CH_2) en posición 1 en lugar de uno de azufre. Está formado por el anillo β -lactámico fusionado a uno pirrolínico, que es insaturado, existiendo un doble enlace entre C_2 y C_3 . Ejemplos son *imipenem* y *meropenem*.

5. Oxapenamas o clavamas; El anillo oxapenamo o clavamo se caracteriza porque el azufre del anillo penamo está sustituido por un átomo de oxígeno. Es el resultado de la fusión de un anillo β -lactámico con un heterocíclico de oxazolidina. El ácido *clavulánico* es el único antimicrobiano comercializado de este grupo.

6. Cefemas; El anillo cefemo está formado por la fusión de uno β -lactámico con otro dihidrotiazínico. Éste tiene un azufre en 1 (tio) y un doble enlace entre C_3 y C_4 (dihidro). Dentro de esta estructura están incluidas las *cefalosporinas* y las *cefamicinas*.

7. Carbacefemas; El anillo carbacefemo, tiene el azufre del anillo dihidrotiazínico de las cefemas está sustituido por un carbono (carba) de un grupo metileno (CH_2). Se caracterizan por tener unido el anillo β -lactámico a uno tetrahidropiridina en lugar de a uno dihidrotiazínico. Un ejemplo es el *loracarbel*.

8. Oxacefemas u oxicefemas; El azufre del anillo dihidrotiazínico de las cefemas está sustituido por un oxígeno (oxa u oxi). Están constituidas por un anillo β -lactámico fusionado a uno dihidrooxacina.

9. Trienemas; Tienen un esqueleto tricíclico, compuesto por un anillo carbapenemo al que se ha condensado uno ciclohexano.

4.1. Resistencias

La aparición y la propogación de las infecciones causadas por bacterias que son resistentes al tratamiento con antibióticos amenaza a la medicina moderna, ya que son muchos los avances médicos que son posibles gracias a la antibioterapia, como la cirugía compleja, los trasplantes de órganos o la administración de quimioterapia para la curación del cáncer. El desarrollo de la resistencia a los antibióticos especialmente la aparición y diseminación de bacterias multirresistentes, y la escasez de tratamientos alternativos, son dos de los mayores problemas de salud pública que es necesario afrontar en la actualidad.

La introducción de la Penicilina en la práctica médica y el posterior desarrollo de nuevos antibióticos, creó la falsa ilusión de que podría conseguirse el control de las infecciones bacterianas. La resistencia a los antimicrobianos es una característica específica de determinadas bacterias que impide que la bacteria pueda ser dañada por ciertos antibióticos y que conocemos como “Resistencia Intrínseca”. Sin embargo la resistencia a antibióticos de mayor importancia es la denominada “Resistencia Adquirida” por la que la bacteria, previamente sensible a un antibiótico puede obtener o desarrollar mecanismos adaptativos que le permitan sobrevivir en su presencia.

Desde el uso masivo de los antibióticos se ha constatado a nivel mundial un aumento muy importante de la prevalencia de la resistencia (Alós, 2015). De acuerdo con la declaración aprobada en la Asamblea de las Naciones Unidas (ONU) que se celebró en septiembre 2016 (<http://www.msssi.es>), el problema de la resistencia a los antibióticos es el “riesgo mundial más grave y urgente para la salud pública”. Durante esta asamblea los jefes de Estado se comprometieron por primera vez a adoptar una estrategia conjunta para abordar las causas de este problema desde un enfoque para una “Única Salud” o “One Health” que implique a la salud humana y salud animal.

Las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad (McNulty et al., 2006), mortalidad y coste del tratamiento que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie. Según el Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) cada año mueren en Europa 25.000 personas como consecuencia directa de infecciones por bacterias multirresistentes a los antibióticos, que además generan un impacto económico de 1.500 millones de euros (ECDC/EMA, 2009). Si no se frena la tendencia creciente de este problema, en 35 años la cifra de muertes por esta causa podría alcanzar las 390.000 al año en Europa, unas 40.000 en España (<http://www.msssi.es>).

En Estados Unidos las bacterias multirresistentes infectan a unos 2 millones de personas al año, de las que al menos 23.000 mueren (“Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Disease Control and Prevention”, 2013). Así en Estados Unidos se calcularon en 2008 unos gastos sociales de entre 10,7 y 15 millones de dólares solo en 188 pacientes adultos de un hospital infectados por bacterias multirresistentes a antibióticos (Roberts et al., 2009). En Estados Unidos, pese a las evidencias y guías de práctica clínica, un 71% de las bronquitis agudas en adultos se trataron con antibióticos entre 1996 y 2010, con un aumento significativo a lo largo de los años (Barnett and Linder, 2014).

En atención primaria en España, donde se consume el 85-90% del total de antibióticos usados en humanos, es posible y deseable una menor prescripción, aunque en los últimos años ha disminuido cuantitativamente (Llor, 2014).

España es uno de los países europeos con mayor afectación por éste problema (Campos and Baquero, 2002), problema que en el actual mundo globalizado facilita a través de alimentos y personas la diseminación de las resistencias. Las consecuencias de esta situación son múltiples, dado que se generan procesos más graves y elongados, mayores posibilidades de contagios, incremento de los efectos secundarios derivados de usos más prolongados y mayor riesgo de producir sensibilizaciones alérgicas, entre otras. Es por tanto, la presión selectiva de los antibióticos usados por el hombre la principal causa de la extensión de la resistencia a antibióticos (Alós, 2015).

Una posible solución sería usar tratamientos cortos y dosis óptimas, como ya indicaba Paul Erlich hace ya un siglo, en el 17 Congreso Internacional de Medicina, el mejor modo de tratar una infección es “hit fast and hit hard” “Golpear rápido y golpear duro”. Así se ha observado que el uso de dosis altas de Amoxicilina (80-90 mg/Kg/día) durante 5 días disminuye significativamente el riesgo de colonización nasofaríngea por neumococos no sensibles a Penicilina al compararlo con el uso estándar (40 mg/kg/día) durante 10 días (Schrag et al., 2001).

4.2 Hipersensibilidad inmediata a antibióticos β -lactámicos

La hipersensibilidad inmediata y por tanto mediada por Ig E a los antibióticos β -lactámicos es la causa más frecuente de las reacciones adversas a medicamentos (Doña et al., 2012; Torres et al., 2010; Romano et al., 2016; Gaeta et al., 2015). Un estudio realizado en Francia de farmacovigilancia sobre reacciones graves mostró que en 55 de los 100 primeros pacientes se pudo confirmar la implicación de un antibiótico β -lactámico y de los cuales 40 se atribuyeron a la Amoxicilina y 15 a cefalosporinas (Kanny et al., 2005). Aunque todos los antibióticos β -lactámicos pueden participar en reacciones de este tipo, en la actualidad la Amoxicilina y en menor grado las cefalosporinas, son los antibióticos más frecuentemente involucrados (Doña et al., 2012; Torres et al., 2010; Romano et al., 2016; Gaeta et al., 2015).

Para las reacciones de hipersensibilidad inmediatas mediadas por IgE, demostrar la presencia de IgE específica del fármaco es por lo general una prueba suficiente de que los pacientes están en riesgo significativo de sufrir una reacción de tipo I, si se les administra el fármaco. Esto es útil en caso de reacciones provocadas por moléculas de alto peso molecular. Así por ejemplo macromoléculas como pueden ser péptidos o hormonas, se pueden considerar intrínsecamente inmunogénicos.

Sin embargo existen otros muchos fármacos con una masa molecular inferior a 1000 daltons, estos fármacos son incapaces de inducir una respuesta inmune en su estado nativo. Para que estos agentes puedan llegar a ser inmunogéneos, deben cumplir dos requisitos; ser capaces de construir enlaces covalentes con proteínas de alto peso molecular, y además deben hacer procesos de presentación de antígenos.

Todo lo que podemos conocer para la respuesta inmune para fármacos antigénicos, está basado principalmente en la teoría de los haptenos (Naisbitt et al., 2001). Así un hapteno se define como un producto químico con bajo peso molecular, propenso a unirse irreversiblemente a las proteínas.

Los antibióticos β -lactámicos son considerados inmunológicamente como haptenos (moléculas de un peso molecular menor de los 10 kDa) y necesitan por tanto de moléculas transportadoras para exhibir una característica inmunogénica y desarrollar así una respuesta de hipersensibilidad inmediata específica. A diferencia de otros fármacos, no precisan ser metabolizados para conjugarse con las moléculas transportadoras ya que son intrínsecamente reactivos debido a la inestabilidad del anillo β -lactámico. Su espontánea y rápida apertura, permite a su grupo carbonilo formar uniones de tipo amida con los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas autólogas (plasmáticas o de membrana) e inducir así modificaciones conformacionales que consiguen poner de manifiesto respuestas inmunológicas, que conllevan a su reconocimiento como extrañas por el sistema inmune. De este modo el número de conjugados hapteno-transportador que se pueden generar y ser reconocidos por el sistema inmune es muy elevado (Weiss and Adkinson, 1988).

Estos haptenos pueden ser determinantes mayores o menores en relación con la cantidad de hapteno disponible para el enlace covalente con la proteína. Así por ejemplo, los determinantes mayores de la alergia a las Penicilinas son derivados peniciloil y penicilánico, y los derivados menores son la bencilpenicilina y el penicilinato, que pueden actuar como sensibilizantes o provocar reacciones alérgicas. (Saxon et al., 1987) (Pérez et al., 1996).

Se han publicado diferentes trabajos en los cuales se identificaban los determinantes antigénicos de la molécula de Penicilina, mediante la producción de anticuerpos monoclonales. Como muestra la Figura 12, Haan (De Haan et al., 1985) y colaboradores demostraron la existencia de al menos tres determinantes antigénicos en dicha estructura: el anillo de tiazolidina, la cadena lateral y el conocido como nuevo determinante antigénico, siendo este último la estructura química formada por la unión entre el grupo carbonilo del anillo β -lactámico con un grupo amino de una proteína transportadora.

En la Figura 12 se muestran estos tres determinantes antigénicos descritos.

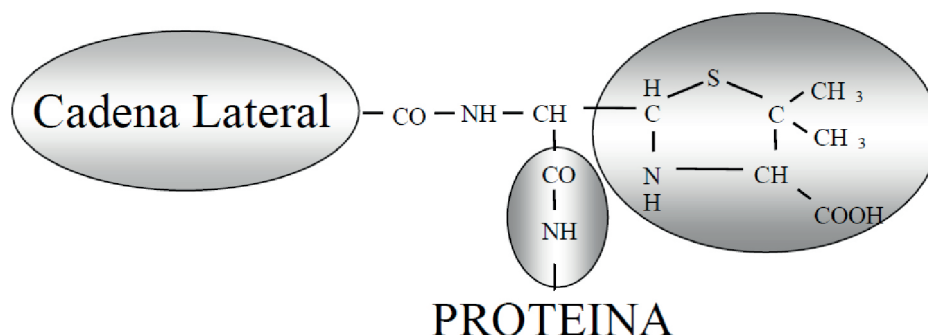


Figura 12. Determinantes antigénicos descritos para la molécula de Penicilina

Es la cadena lateral la que caracteriza y diferencia a las Penicilinas, y siendo reconocida por anticuerpos IgE específicos en muchas reacciones alérgicas. Por tanto, parece claro iniciar estudios con otros metabolitos de las Penicilinas.

La Amoxicilina, fue utilizada por primera vez en 1972, es un antibiótico semisintético derivado de la Penicilina, se trata de un aminopenicilina. Las aminopenicilinas son moléculas a las que se ha añadido un grupo amino en la posición α de la cadena lateral de la bencilpenicilina, lo que les confiere un alto grado de estabilidad en medio ácido y un aumento de actividad frente a gram negativos. La Amoxicilina presenta un grupo oxidrilo en la posición para de la cadena lateral del benceno.

Las aminopenicilinas son muy empleadas debido a su amplio espectro de actividad. Se utilizan fundamentalmente en infecciones respiratorias de vías altas y bajas, gastroenteritis bacterianas e infecciones urinarias. También se han utilizado en el tratamiento de la endocarditis por enterococos, la meningitis y la sepsis en combinación con otros antimicrobianos, sobre todo con aminoglucósidos. La Amoxicilina se ha utilizado también para la eliminación de portadores de *Salmonella typhi*. La Amoxicilina es utilizada en el tratamiento de las borreliosis, excepto en la neuroborreliosis (Taylor and Simpson, 2005), así como en la terapia combinada para la erradicación de *Helicobacter pylori* (Peterson et al., 2000).

La Amoxicilina tiene un bajo peso molecular (365,4 g/mol). Así del mismo modo que se estudiaron los determinantes de Penicilina, también se han estudiado los determinantes de la Amoxicilina comprobándose la importancia de la cadena lateral (Zhao et al., 2001) para generar una respuesta de anticuerpo IgE específicos.

La estructura de la Amoxicilina se muestra en la Figura 13.

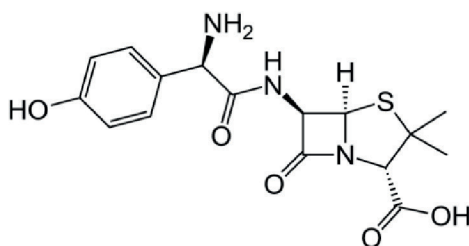


Figura 13. Amoxicilina

La Amoxicilina puede inducir reacciones selectivas en una gran proporción de los casos, lo que explica que los pacientes puedan reaccionar a la Amoxicilina pero tolerar la Penicilina (Blanca et al., 1990) (Bousquet et al., 2008) (Blanca-López et al., 2015). Este hallazgo, junto con el aportado por otros autores (Audicana et al., 1994; Blanca et al., 2002), ha demostrado que la cadena lateral de las Penicilinas puede comportarse como un nuevo determinante antigénico con relevancia clínica tanto en el diagnóstico, como en la reactividad cruzada entre penicilinas y cefalosporinas.

Estos hechos, junto con qué, la Amoxicilina se considera hoy en día el origen más frecuente de alergia a β -lactámicos, representando en nuestro país más del 70% de los casos (García et al., 2012). Surge la necesidad de tomar en consideración también las cadenas laterales específicas de cada antibiótico, pues a finales del 1980 se describieron la aparición de reacciones adversas desencadenadas por las cadenas laterales específicas de la Amoxicilina, que motivaron la necesidad de diagnóstico de hipersensibilidad previo al antibiótico (Blanca et al., 1994; Antúnez et al., 2006). En consecuencia la inclusión de la Amoxicilina al panel de haptenos en las pruebas diagnósticas cutáneas, ha sido apoyada por diversos estudios (Torres et al., 2001) y en la actualidad está recomendado por la red Europea de alergia a medicamentos (ENDA) para las pruebas cutáneas en la piel (Antúnez et al., 2006; Romano et al., 2004; Bousquet et al., 2005).

4.2.1 Clasificación de las reacciones

Las reacciones de hipersensibilidad a antibióticos β -lactámicos se clasifican atendiendo al intervalo de tiempo transcurrido entre su administración y la aparición de los síntomas (Barberán et al., 2008).

Así pueden ser clasificadas en:

4.2.1.1 Reacciones inmediatas

Se desarrollan en la primera hora tras la administración del medicamento, aproximadamente entre los 2 y 30 minutos tras la administración. Su mecanismo inmunológico suele estar mediado por Ig E específica, y producidas por los determinantes menores en casi el 90% de los casos. Pueden presentar manifestaciones leves como urticaria/angioedema y rinitis que pueden aparecer en los primeros minutos o graves como el choque anafiláctico. Las reacciones anafilácticas aparecen con una frecuencia aproximada de 0,2/10.000 tratamientos.

4.2.1.2 Reacciones aceleradas

Se desarrollan entre la segunda hora y las 72 horas tras la administración del medicamento. Revisten poca gravedad y se manifiesta por urticaria/angioedema, rinitis, broncoespasmo moderado, eritema o prurito, siendo el edema laríngeo el más grave de todos ellos. Están mediadas por IgE y producidas principalmente por los determinantes mayores.

4.2.1.3 Reacciones tardías

Se desarrollan a partir de las 72 horas de la administración del medicamento, sobre todo se presentan con la ampicilina (en los enfermos con mononucleosis infecciosa, leucemias linfoides y otros trastornos linfocitarios). Son las más frecuentes, en especial el exantema morbiliforme, que puede aparecer como tal o combinación con una urticaria incluso petequiral. Normalmente están mediadas por linfocitos T manifestándose de forma muy variada.

En términos generales las reacciones aceleradas y tardías suelen encuadrarse como no inmediatas

y en su mayoría mediadas por linfocitos T (Holgante et al., 2012) presentando reacciones no graves de índole cutánea consistentes en exantemas maculopapulares y urticarias.

4.3 Diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata a antibióticos β -lactámicos

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata, se desarrollan como resultado de la unión específica del determinante antigénico al anticuerpo IgE fijado a la superficie de los mastocitos y basófilos, creando una unión multivalente como se observa en la Figura 14.

Tras la exposición al antibiótico y la formación de haptenos-proteína, se induce la formación y fijación de IgE antibiótico específica en la superficie de mastocitos o basófilos. La posterior estimulación tras la fijación de la IgE al antibiótico, induce la liberación de mediadores por ejemplo la histamina, y la producción de nuevos mediadores por ejemplo leucotrienos y citoquinas.

Los mediadores preformados estimulan una respuesta en minutos, mientras que el componente inflamatorio se desarrolla después de varias horas, el tiempo necesario para la síntesis de proteínas y el reclutamiento de células inmunitarias, como se muestra esquemáticamente en la Figura 15.

La reacción de hipersensibilidad inmediata mejor estudiada es la mediada por β lactamasas, con anafilaxia, angioedema, urticaria, rinitis, conjuntivitis, y broncoespasmo.

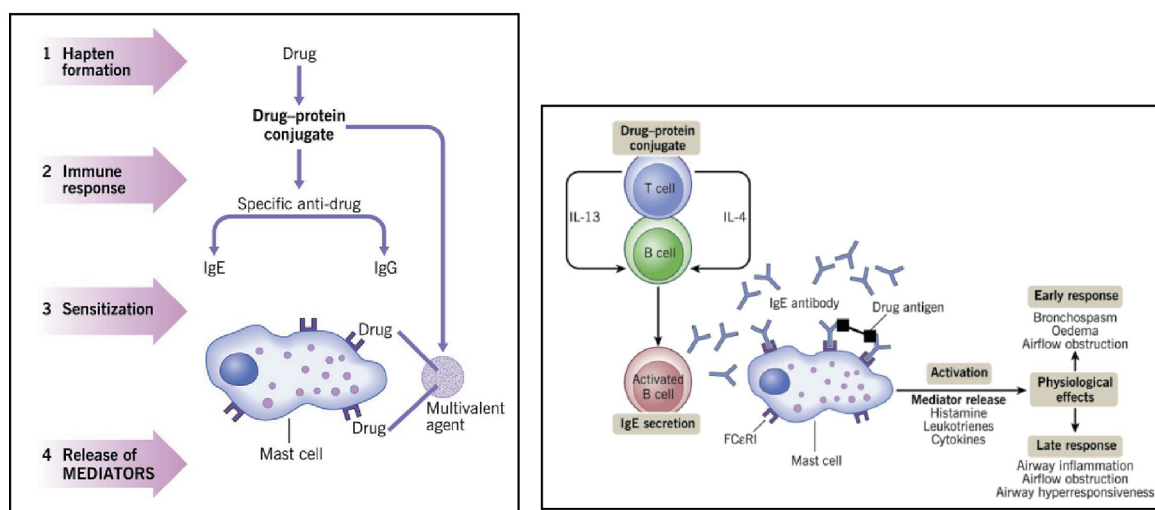


Figura 14 A. Fase de sensibilización al medicamento. (Holgante et al., 2012). Generación de antígenos multivalentes del medicamento que interaccionan con los mastocitos sensibilizados con IgE.

Figura 15 B. Fase efectora, después de la re-exposición al medicamento. (Holgante et al., 2012). Generación de la producción de IgE por cambio en la cooperación T-B, que conduce en presencia de las citoquinas IL-4 e IL-13 a activar las células B a producir grandes cantidades de IgE específica y a su fijación a los receptores de la misma sobre el mastocito

La dificultad diagnóstica y la naturaleza transitoria de la sensibilización complican la interpretación de los resultados y por tanto los estudios de prevalencia, la morbilidad e incidencia de anafilaxis, así como la mortalidad atribuible a la hipersensibilidad a antibióticos β -lactámicos (Johanness et al., 2007).

La Penicilina ha sido el antibiótico β -lactámico más estudiado y representa el prototipo de estudio de las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos. De éste modo conocemos que los pacientes alérgicos no predisponen al individuo a desarrollar una hipersensibilidad a la Penicilina, pero sí de que presente un mayor riesgo de reacción anafiláctica grave o mortal posterior (Weiss and Adkinson, 1988); así como que los individuos que han tenido una reacción previa alérgica a Penicilina presenta un riesgo entre 4 y 6 veces superior de sufrir reacciones posteriores a otros antibióticos β -lactámicos (Apter et al., 2006).

Las claves para un correcto diagnóstico de hipersensibilidad pasan inicialmente por conocer la existencia de antecedentes de alergia a Penicilina, con el consiguiente acotamiento que representa la pérdida temporal de la sensibilidad. La prueba cutánea previa con Penicilina y posteriormente con el presunto antibiótico implicado sigue conformando parte importante del algoritmo diagnóstico.

4.3.1 Diagnóstico “in vivo”

Las técnicas “in vivo”, son aquellas técnicas diagnósticas que se realizan en el propio paciente. Podemos clasificar las pruebas cutáneas según el tipo de sensibilización que queramos estudiar;

1. Sensibilización de tipo inmediato; mediada por IgE, para lo cual utilizamos la prueba del “skin prick test” o la prueba intradérmica como métodos más habituales. La reacción objetivada con estas pruebas está inducida fundamentalmente por la degranulación de los mastocitos cutáneos al contacto con el alérgeno, con la consiguiente liberación de mediadores como la histamina, triptasa, neuromediadores, etc, responsables de la respuesta inmediata. Podemos encontrar una respuesta tardía a las 6-8 horas, como consecuencia de procesos asociados a la respuesta inicial, ya que muchos de los mediadores liberados por los mastocitos activados son mediadores quimiotácticos que actúan atrayendo hacia el lugar de la reacción células inflamatorias como eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, que contribuyen a perpetuar la inflamación. Los linfocitos CD4+ juegan un papel en la puesta en marcha y regulación de la respuesta tardía, por la generación y liberación de citoquinas.

2. Sensibilización tardía; en la que interviene la inmunidad celular (linfocitos T) para lo que utilizamos las pruebas epicutáneas, también conocidas como pruebas del parche. La reacción alcanza su máxima expresión entre las 24-72 horas y las células que participan en el infiltrado son predominantemente linfocitos del tipo Th1 y monocitos.

En 1873 fue Charles Harrison Blackey quien describió el “test scratch” en la piel, denominado test de escarificación, aplicando extractos de pólenes sobre su propia piel, lo que constituyó un

punto de partida en el desarrollo del diagnóstico alérgico. Así este test de escarificación fue descrito con más detalle en 1912 por Oscar Menderson Schloss (Schloss, 1912), pero será Isaac Walker quién se encargará más adelante de hacerlo más popular, denominándolo test de asma (Walker, 1917).

Nuevamente fue Von Pirquet quién demostró por primera vez en Viena el 6 de junio de 1907 (Von Pirquet, 1907) un test denominado; “skin prick test”, siendo el precursor del mismo cuyo fundamento es el mismo que el del test de escarificación. Pero es a *Mrs. Helmtraut Ebruster* a quién debemos atribuirle el uso de la prueba del “skin prick test” tal y como lo concebimos a día de hoy (Ebruster, 1959).

La prueba del “skin prick test” se realiza colocando gotas de los extractos que queremos estudiar y de una solución control, sobre la superficie volar del antebrazo. Posteriormente, con una lanceta de 1 mm de punta, se hace una puntura a través de la gota y se inserta en la epidermis con un pequeño ángulo agudo.

La prueba intradérmica era la prueba más difundida y utilizada antes de que se estableciese el “skin prick test”. Fue introducida por Mantoux en 1908, y adaptada por Schloss en 1912. Consiste en la inyección intradérmica de 0,02 a 0,05 ml de la solución del alérgeno a testar, formando una pápula de 2-3 mm de diámetro. Las pruebas se pueden realizar en el antebrazo o en la espalda, al igual que con los prick, manteniendo entre las diferentes gotas una distancia de al menos 2 cm con el fin de evitar resultados enmascarados en caso de que se produzcan positividades. Si se realizan en la espalda, también hay que cuidar la distancia a la línea vertebral ya que se pueden originar falsos positivos debido a los reflejos axónicos.

Hay que tener en cuenta que la concentración utilizada en las pruebas intracutáneas es de entre 1.000 a 10.000 veces menor que la necesaria para una prueba de “skin prick test” positiva y que las pruebas intradérmicas son más sensibles que las pruebas cutáneas por prick, pero sin embargo existe un mayor riesgo de obtener un falso positivo, ya que pueden resultar irritativas e incluso que den lugar a reacciones anafilácticas con mayor frecuencia.

La lectura de las pruebas cutáneas en “skin prick test” se realiza a los 15-20 minutos de realizada la punción, considerándose una prueba positiva cuando se obtiene una pápula mayor a 3 milímetros con una respuesta negativa del control salino. En la prueba intradérmica se debe marcar el diámetro inicial de la pápula considerándose un resultado positivo cuando tras 15-20 minutos existe un aumento del diámetro de más de 3 mm.

Cualquier estudio con pruebas cutáneas requiere testificar con un control negativo y un control positivo. El control negativo habitualmente es el conservante utilizado, esto nos permite valorar que no ocasiona reacción inespecífica. El control positivo habitualmente es la histamina, nos permite valorar la respuesta cutánea y comparar con el resto de positividades. Por otra parte detecta la supresión de reactividad en aquellos pacientes que se encuentran en tratamientos con fármacos que puedan inhibir la respuesta cutánea, como por ejemplos los antihistamínicos o pacientes con baja reactividad a la histamina, además nos permite valorar si la técnica está bien realizada.

La Tabla 5 muestra las diferencias entre el “skin prick test” y las pruebas intradérmicas.

Diferencia “skin prick test”/intradermo		
	Prick	Intradermo
Técnica sencilla	Sí	Sí
Rápidez	Sí	Relativa
Molesta	No	Sí
Falsos positivos	Raro	Posible
Falsos negativos	Posible	Raro
Seguridad	Sí	± (Sin evaluar)
Detecta IgE	Sí	Sí

Tabla 5. Diagnósticos “skin prick test” *versus* pruebas intradérmicas

La prueba cutánea mediante las técnicas del “skin prick test” o el intradermo, constituyen la primera piedra angular del diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata a los antibióticos β -lactámicos y en general a cualquier tipo de medicamento. Mientras que el “skin prick test” es más simple y seguro el intradermo es más sensible, pero también es más peligrosa cuando no se utiliza correctamente, siendo la muerte una de las consecuencias del uso incorrecto de la misma (Harris et al., 1950). Ambas pruebas se realizan en la superficie volar del antebrazo, en primer lugar se realizan las pruebas por “skin prick test” y si tras 15-20 minutos la lectura de las mismas es negativa, se realizan las pruebas intradérmicas.

El Grupo de Trabajo en Alergia a Medicamentos (ENDA) y la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) publicó recientemente una Guía con recomendaciones en relación con la hipersensibilidad a antibióticos β -lactámicos (Brockow et al., 2013), que incorpora propuestas de ensayo de las concentraciones a emplear en las pruebas cutáneas.

La Tabla 6 muestra las concentraciones no irritantes en pruebas cutáneas con antibióticos β -lactámicos:

Antibiótico	“Skin Prick Test”	Intradermo
Determinante mayor: Peniciloil-poli-L-lisina (PPL)	5×10^{-5} mM	5×10^{-5} mM
Determinantes menores (MDM/DM)	2×10^{-2} mM	2×10^{-2} mM
Bencilpenicilina	10.000 UI	10.000 UI
Amoxicilina	20 mg/mL	20 mg/mL
Ampicilina	20 mg/mL	20 mg/mL
Cefalosporinas	2 mg/mL	2 mg/mL

Tabla 6. Concentraciones en pruebas cutáneas con antibióticos β -lactámicos

Una propuesta de algoritmo diagnóstico modificado y reducido, sobre la base del preconizado por el Grupo ENDA y propuesto sobre la base de un estudio realizado en 1.032 pacientes, se muestra en la siguiente Figura 16 (García et al., 2012):

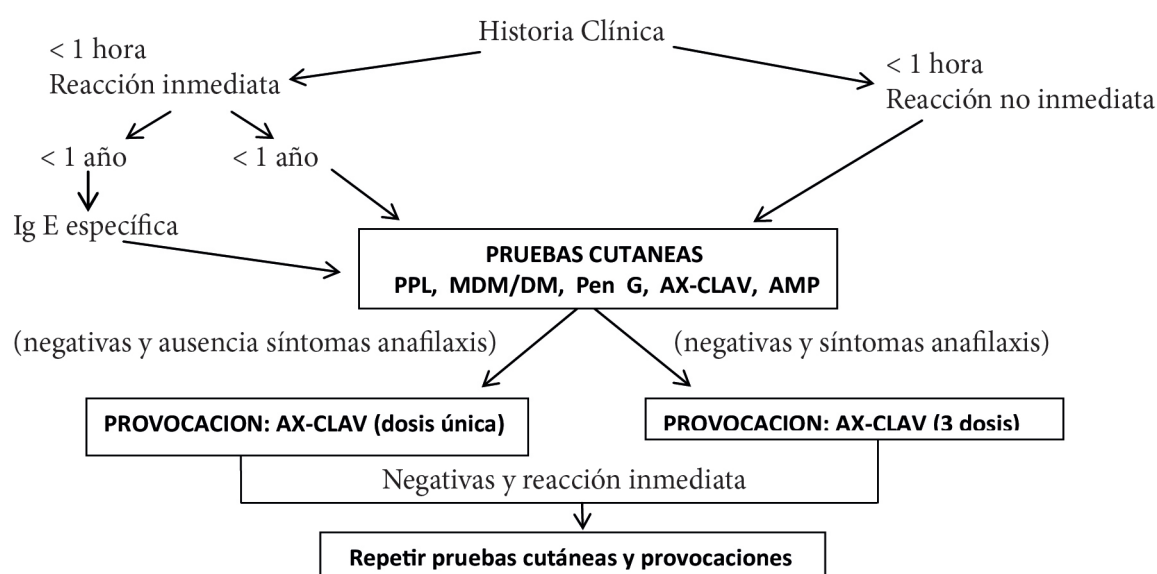


Figura 16. Algoritmo diagnóstico (García et al., 2012)

Las pruebas de administración controlada en el diagnóstico de las reacciones de hipersensibilidad a medicamentos han sido igualmente establecidas por el Grupo ENDA y la EAACI (Brockow et al., 2013). Este tipo de pruebas, también conocido como de provocación controlada, representan el denominado “estándar de oro” a la hora de establecer o excluir el diagnóstico de hipersensibilidad y deben ser realizados sólo si el resto de pruebas no han permitido alcanzar conclusiones relevantes en relación con el correcto diagnóstico. Antes de acudir a éste tipo de pruebas debe evaluarse adecuadamente el riesgo-beneficio del paciente en relación con la patología del paciente y la poca probabilidad de sustitución del medicamento y en cualquier caso deben excluirse los pacientes con hipersensibilidad demostrada y elevada posibilidad de reactividad cruzada. El fármaco debe ser administrado de la misma manera que produjo la reacción, siendo la vía de administración preferible la oral, dado que la absorción es más lenta y si se presentara una reacción, ésta sería generalmente leve y podría, en cualquier caso, ser adecuadamente controlada.

Las dosis máximas recomendadas en el estudio de los β -lactámicos son (Romano et al., 2005):

- Bencilpenicilina: 106 UI /mL.
- Amoxicilina y Penicilina V: 1 g.
- Cefalosporinas: 500 mg

4.3.2 Diagnóstico “in vitro”

Las técnicas “in vitro” son un complemento diagnóstico a la historia clínica y a las pruebas realizadas “in vivo”. Las pruebas “in vitro” nos confirman el diagnóstico sospechado por la historia y las pruebas cutáneas, o bien se realizan cuando no se puedan realizar los tests “in vivo”,

por circunstancias especiales de los pacientes.

Es fundamental que las pruebas de laboratorio sean sensibles; tienen que detectar resultados positivos en los pacientes alérgicos cuando enfrentamos el suero al alérgeno específico. Por otra parte tienen que ser además específicas, es decir, debemos obtener un resultado negativo cuando estudiamos el suero de una persona que no es alérgica al alérgeno que le suministramos.

Podríamos clasificar las técnicas “in vitro” en dos grandes grupos; las que estudian la reacción antígeno-anticuerpo, como serían la IgE sérica, IgE antígeno específica e IgG y las que permiten determinar mediadores que se liberan en la reacción antígeno-anticuerpo, tales como el test de liberación de histamina, la determinación de leucotrienos, la determinación de triptasa, el test de activación de basófilos y la proteína catiónica del eosinófilo.

El empleo del diagnóstico “in vitro” en el estudio de la hipersensibilidad inmediata a medicamentos es de vital importancia, dado que de éste modo, no se expone al paciente a la posible aparición de las reacciones que pueden inducirse durante el diagnóstico “in vivo”.

Los métodos más empleados se encuentran en relación con la determinación de IgE específica y de los mediadores inflamatorios.

IgE Específica

Una de las propiedades del anticuerpo IgE es unirse mediante el receptor Fc a sus receptores específicos en la superficie de mastocitos y basófilos, sensibilizando estas células de tal forma que, cuando se encuentran nuevamente con el antígeno específico, sean activadas y liberen sus mediadores inflamatorios.

El antibiótico unido covalentemente reacciona con la IgE específica del suero del paciente. Se realiza un proceso de lavado y eliminación de aquella IgE que no se haya fijado, y posteriormente se añade una anti IgE marcada fluorescentemente. Tras un proceso de incubación, lavado y la adición del sustrato del marcador fluorescente se detiene la reacción y, se mide el grado de fluorescencia emitido, obteniéndose valores entre 0 y 100 KU/L. La Figura 17 muestra un esquema de este proceso.

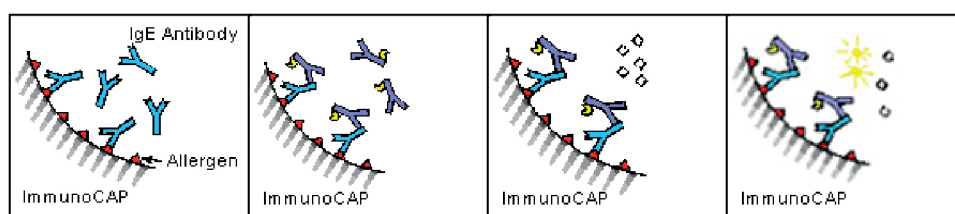


Figura 17. Esquema del proceso. <http://www.phadia.com/en/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Lab-Tests/sIgE/Test-Principle>

La prueba se considera como negativa cuando el valor obtenido es menor de 0,35 KU/L. La siguiente Tabla 7 mide los valores de IgE antígeno-específica.

Valores de IgE antígeno-específica	
IgE antígeno específica (KU/l)	Valoración
> 0,35 (clase 0)	Indetectable
0,35 - 0,7 (clase 1)	Débil
0,7 - 3,5 (clase 2)	Moderada
3,5 - 17,5 (clase 3)	Elevada
17,5 - 50 (clase 4)	Muy elevada
50 - 100 (clase 5)	Muy elevada
>100 (clase 6)	Muy elevada

Tabla 7. Valores de IgE antígeno-específica

La sensibilidad de esta técnica en el caso de la hipersensibilidad inmediata a antibióticos β -lactámicos se estima entre el 12,5% y el 54% con una especificidad del 90-100%, por lo que este tipo de determinación es muy cuestionable y en muy raros casos discriminatoria (Fontaine et al., 2007). No obstante, hay que tener en cuenta que la elevación de la IgE no es patognomónica de los procesos alérgicos.

En la actualidad únicamente se encuentran disponibles comercialmente las determinaciones de IgE específica frente a Penicilina G, Penicilina V, Amoxicilina y Ampicilina, mediante sistemas de fluoroenzimoinmunensayo (FEIA) Immuno CAP system.

Mediadores inflamatorios

Entre los mediadores de la inflamación existen varias alternativas:

La triptasa es una proteasa neutra de los mastocitos humanos, considerada un marcador de reacciones mastocitarias, que se liberan después de un estímulo de tipo inflamatorio junto con la histamina. Se puede detectar en suero mediante enzimoimmunoensayo a las 3 horas de producirse la reacción y hasta 12-24 horas después. Esta técnica si bien pone de manifiesto el origen inmunitario de la reacción, su inespecificidad es muy elevada a la hora de valorar el antibiótico causante.

La histamina liberada a partir de basófilos en contacto con el antibiótico, es un inmunoensayo que mide la cantidad de histamina que se libera del mastocito de los tejidos o de los basófilos sanguíneos cuando se produce la reacción antígeno-anticuerpo. Para el caso de los antibióticos β -lactámicos arroja unos valores de sensibilidad y especificidad próximos al 60%, con un valor predictivo positivo del 50% y un valor predictivo negativo del 81%, lo cual conlleva a que esta prueba no sea muy utilizada en la actualidad (Demoly et al., 1999).

Los mediadores formados de “novo” como los leucotrienos C4 y sus metabolitos, o sulfidoleucotrienos (CAST), presentan también una baja sensibilidad, menor del 50% y una especificidad en el entorno del 50% (De Weck and Sanz, 2004).

La expresión de antígenos de membrana CD48, CD18, CD63 de basófilos activados tras el reconocimiento del antibiótico y la liberación de sus mediadores, puede establecerse mediante citometría de flujo muy específicamente en el caso del CD63 en relación con antibióticos β -lactámicos con una sensibilidad, del 50% y una especificidad del 93,3% (Sanz et al., 2002). Otros marcadores como el CD203c, pueden incrementar la sensibilidad del CD63 en el diagnóstico de la alergia a Amoxicilina (Abuaf et al., 2008).

OBJETIVOS

Los antibióticos β -lactámicos son los medicamentos más frecuentemente implicados en las reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por IgE. La necesaria y adecuada identificación del antibiótico implicado en la sensibilización, conlleva la necesidad de valoración de múltiples factores relacionados con los antecedentes del paciente, el tiempo transcurrido entre la reacción y la exploración, y la disponibilidad de reactivos para inducir reacciones sistémicas o inespecíficas en las pruebas cutáneas diagnósticas.

A ello hay que añadirle la práctica ausencia de reactivos para técnicas “in vitro” y la dificultad de acceso a las mismas, lo que hace entre otras, que la prueba cutánea represente el segundo de los valores de importancia tras la prueba de provocación, estándar de referencia no exento de riesgos y complejidad en el diagnóstico de esta sensibilización.

La Penicilina y sus determinantes muestran cierto grado de valor para predecir reacciones a otros antibióticos β -lactámicos, sin embargo existe un importante número de pacientes con reacciones a Amoxicilina, Ampicilina y cadenas laterales de Cefalosporinas que no pueden ser detectados mediante estos determinantes. Debido a las modificaciones epidemiológicas en la población alérgica, causadas por el aumento del uso de Amoxicilina sódica, se justifica una revisión de las pautas de diagnóstico y la incorporación de nuevas estructuras que faciliten la sensibilidad del diagnóstico de hipersensibilidad inmediata a la Amoxicilina sódica.

En base a lo expuesto en esta memoria se plantean los siguientes objetivos:

- 1.- **Desarrollar** la síntesis de un derivado hapténico de Amoxicilina sódica; resultado de la unión de 8 cadenas de lisina, unidas cada una de ellas a un resto amoxiciloico.
- 2.- **Realizar una caracterización** del derivado hapténico: Amoxiciloil octa L-lisina, mediante las determinaciones de RMN e IR, la valoración de pureza y sustancias relacionadas a través de un sistema cromatográfico de HPLC, y la determinación del contenido en disolventes residuales y agua.
- 3.- **Demostrar** la estabilidad de la molécula de Amoxiciloil octa L-lisina.
- 4.- **Estudiar** el perfil de seguridad en animales de experimentación de la molécula de Amoxiciloil octa L-lisina.
- 5.- **Incorporar** nuevas propuestas “in vitro” en relación con el diagnóstico de hipersensibilidad inmediata a Amoxicilina sódica, mediante la técnica de liberación de histamina. Evaluar la eficacia y sensibilidad de la molécula de Amoxiciloil octa L-lisina como agente diagnóstico “in vitro”.
- 6.- **Determinar** la seguridad y sensibilidad de las pruebas cutáneas con Amoxiciloil octa L-lisina a los algoritmos diagnósticos propuestos por el grupo de trabajo de referencia (ENDA) de la “European Academy of Allergy and Clinical Immunology” (EAACI), en relación con el uso de Amoxicilina en un ensayo de dosis en humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales de Partida

El punto de partida del desarrollo experimental ha sido la síntesis de la molécula de Amoxiciloil octa L-Lisina, en la misma se produce la unión de restos de amoxiciloico con cadenas de lisina. Siendo los materiales de partida las moléculas: Amoxicilina sódica cuyo proveedor ha sido Sandoz International GMBH, y octa L-Lisina suministrado por BCN Peptides S.A.

1.1 Amoxicilina Sódica

La Amoxicilina es un antibiótico de amplio espectro desarrollado por Beecham Pharmaceuticals en 1972, que se utiliza en forma trihidrato en formulaciones orales y en forma de sal sódica en parenterales.

La Amoxicilina sódica ($C_{16}H_{18}N_3NaO_5S$) estructuralmente presenta un PM 387,4 D y número CAS 34642-77-8. La Figura 18 muestra su estructura.

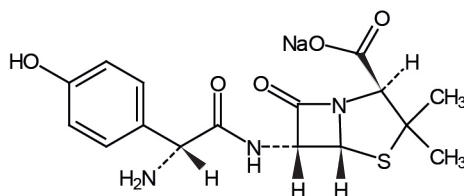


Figura 18. Estructura de Amoxicilina sódica. [2S [2 α ,5 α ,6 β (S*)]]-6 [[amino(4 hidroxifenil)acetil]amino]-3,3 dimetil-7 oxo-4 tia-1 azabicyclo[3.2.0]heptano-2 carboxílico.

Organolépticamente presenta una apariencia de polvo blanquecino, que en ocasiones adquiere un matiz rosáceo, amorfo e higroscópico y que puede llegar a tener un cierto olor a sulfuros, característico de muchas Penicilinas.

Su solubilidad, entre 15 y 25°C, se muestra en la Tabla 8.

Solvente	Solubilidad (mg/ml)
Agua	>1000
Etanol	10-33
Cloroformo	<0.1
Dieter etílico	<0.1
Acetona	0.1-1.0

Tabla 8. Solubilidad de amoxicilina sódica, expresada en mg/ml en diferentes solventes.

1.1.1 Productos de degradación de la amoxicilina sódica

Las estructuras de degradación formadas en soluciones ácidas fuertes, pueden observarse en el esquema de degradación que se muestra en la Figura 19.

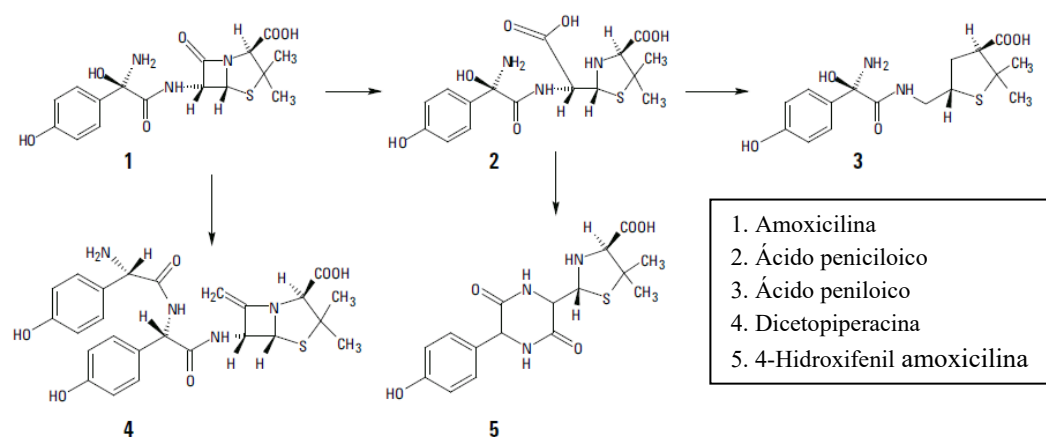


Figura 19. Degradación de la amoxicilina. (Edgar and Ralf, 2005; Koeberlein and Huesgen, 2010)

Como en otras Penicilinas, es común que la hidrólisis en medios alcalinos acuosos de la Amoxicilina genere como producto de degradación el ácido peniciloico. Por otro lado, la degradación de la Amoxicilina en soluciones acuosas que contengan fosfatos, sorbitol y sulfato de zinc, o bien etanolamina y sulfato de zinc, conduce a los productos de degradación de la Amoxicilina (5R) piperazina-2,5-diona y su epímero, Amoxicilina (5S) piperizana-2,5-diona (impureza C), siendo otro producto de degradación común el dímero de la Amoxicilina J y K.

Las siguientes figuras muestran todas las estructuras de degradación descritas en farmacopea europea (Ph. Eur. 8.7 Edición, 01 abril 16) para la molécula Amoxicilina sódica.

• **Impureza A:** Molécula obtenida de la hidrólisis de la Amoxicilina. La Figura 20 muestra su estructura.

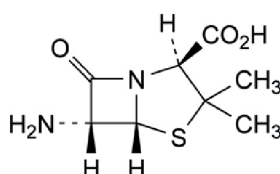


Figura 20. Estructura de la impureza A. (2S,5R,6R)-6-amino-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabíciclo [3.2.0] heptano-2-ácido carboxílico (ácido 6-aminopenicilánico).

• **Impureza B:** Corresponde a uno de los enantiómeros de la Amoxicilina. Su origen puede ser variado, generalmente proviene de una síntesis no estereoselectiva. Aunque en condiciones normales, en medio básico, podría darse la racemización. La Figura 21 muestra su estructura.

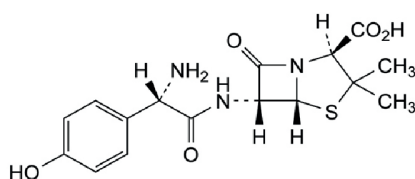


Figura 21. Estructura de la impureza B. (2S,5R,6R)-6- [[(2S)-2-amino-2-(4 hidroxifenil)- acetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabíciclo [3.2.0] heptano-2-ácido carboxílico (L-amoxicilina).

- **Impureza C:** Se produce tras la rotura del ciclo de la β -lactama, con posterior ciclación con la amina enantiomérica. La Figura 22 muestra su estructura.

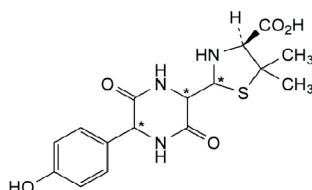


Figura 22. Estructura de la Impureza C. (4S)-2-[5-(4-hidroxifenil)-3,6-dioxopiperacina-2-il]-5,5-dimetiltiazolidina-4-ácido carboxílico (dicetopiperacina).

- **Impureza D:** Se produce por la apertura del anillo de lactama. La Figura 23 muestra su estructura.

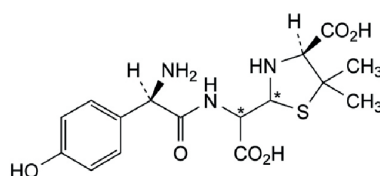


Figura 23. Estructura de la Impureza D. (4S)-2-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetil]amino]carboximetil]-5,5-dimetiltiazolidina-4-ácido carboxílico (ácido peniciloico de amoxicilina).

- **Impureza E:** Se produce por la hidrólisis de anillo β -lactámico, seguido de una posterior descarboxilación. La Figura 24 muestra su estructura.

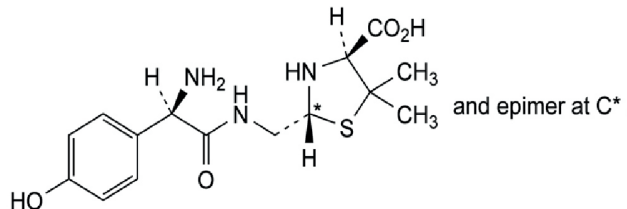


Figura 24. Estructura de la Impureza E. (2RS,4S)-2-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetil]-amino]metil]-5,5-dimetiltiazolidina-4-ácido carboxílico (ácido peniloico de amoxicilina).

- **Impureza F:** Puede tener dos orígenes. Puede ser un precursor de la síntesis o se puede llegar a él, a través de la impureza C, con eliminación del anillo tetrahidrotiazol vía equilibrio tautomérico y ataque nucleófilo. La vía más frecuente es la primera, mientras que para la segunda necesita de unas condiciones un tanto extremas. La Figura 25 muestra su estructura.

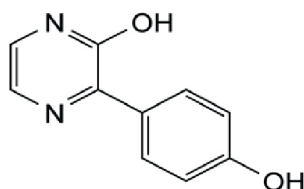


Figura 25. Estructura de la Impureza F. 3-(4-hidroxifenil)pirazin-2-ol.

- **Impureza G:** Es la molécula resultado de obtener el ácido 6-aminopenicilánico, tras la degradación ácida/básica de la amida. El fenol con grupo aldehído puede reaccionar espontáneamente con la amina secundaria de la Amoxicilina. E incluso no es necesario que haya

medio ácido o básico, la Amoxicilina puede reaccionar consigo misma en un ataque nucleófilo a la amida. La Figura 26 muestra su estructura.

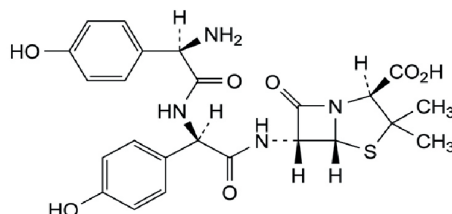


Figura 26. Estructura de la Impureza G. (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetil]amino] 2-(4-hidroxifenil) acetil]amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano 2-ácido carboxílico (D-(4-hidroxifenil) glicilamoxicilina).

• **Impureza H:** Procede de una apertura del ciclo de lactama, seguida de una eliminación de un etano tiol. También puede ser un precursor de la síntesis. La Figura 27 muestra su estructura.

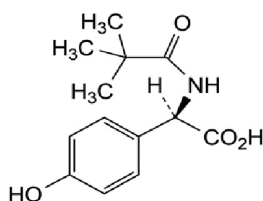


Figura 27. Estructura de la Impureza H. (2R)-2-[(2,2-dimetilpropanol) amino]-2-(4-hidroxifenil) ácido acético.

• **Impureza I:** Se ocasiona cuando se produce la molécula denominada impureza A, por ataque en medio ácido. En ese medio de reacción existe una molécula resultante que es la denominada impureza I. La Figura 28 muestra su estructura.

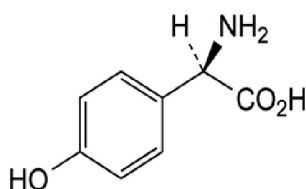


Figura 28. Estructura de la Impureza I. (2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) ácido acético

• **Impurezas J y K:** Estructuras ocasionadas por la polimerización de la Amoxicilina, tras reacción mediante un enlace amida (similar al peptídico) la molécula que se obtiene es la impureza J, si la reacción es una esterificación la molécula resultante es la impureza K. Las Figuras 29 y 30 muestran su estructura.

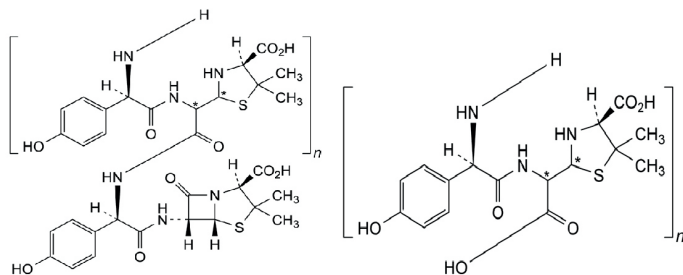


Figura 29. Estructura de la Impureza J. Co-oligómero de la amoxicilina y ácido peniciloico de amoxicilina.

Figura 30. Estructura de la Impureza K. Oligómero del ácido peniciloico de amoxicilina.

1.2 Octa L-lisina

La octa L-lisina ($C_{46}H_{98}N_{16}O_9$), L-Lysyl- L-Lysl- L-Lysl- L-Lysl- L-Lysl- L-Lysl- L-Lysl- L-Lisina es un polvo blanco con un peso molecular estimado en base a la masa monoisotópica de los isótopos de 1042,77 u.m.a.

La estructura de la octa L-lisina se muestra en la Figura 31:

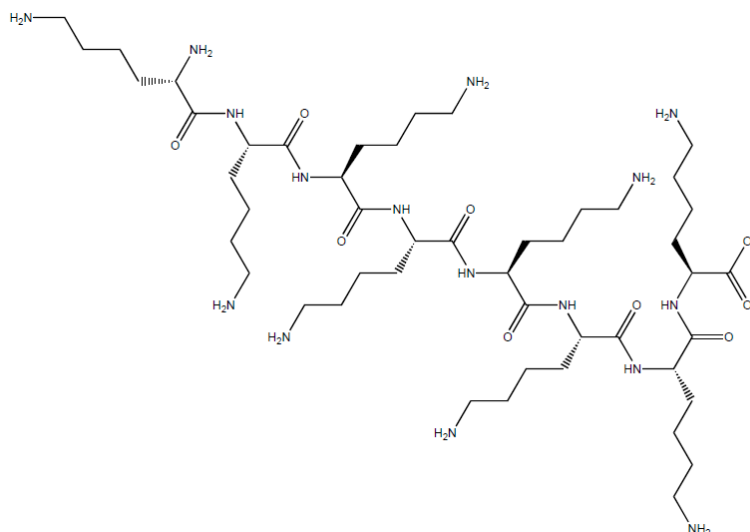


Figura 31. Estructura de octa L-lisina. H-Lys- Lys- Lys-Lys- Lys- Lys- Lys- Lys-OH

La octa L-lisina se obtiene mediante una síntesis en fase sólida, a partir de una resina 2-cloro tritilo. Esta metodología de síntesis se denomina Fmoc/tBu y consiste en la incorporación secuencial de ocho residuos de lisina en forma de Fmoc-L-Lys (Boc)-OH. Requiere de varias etapas, que se describen a continuación.

• **Paso 1:** Acondicionamiento de la resina. Se parte de 2 gramos de resina 2-cloro tritilo (ClTrt-resina) y se realizan lavados con diclorometano. Se realiza un primer lavado de 2 minutos, y posteriormente dos lavados de 15 minutos cada uno. El disolvente se filtra después de cada lavado.

• **Paso 2:** Se protege el grupo amino en posición ϵ del aminoácido lisina con tertbutoxicarbonilo (Boc), el objetivo de dicha protección es que no reaccione hasta que tenga lugar su desprotección selectiva. Después se protege el grupo amino en posición α con 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). De esta manera los dos grupos amino de la lisina están protegidos de forma distinta.

Se pesan 0,7 equivalentes de Fmoc-L-Lys (Boc)-OH respecto al grado inicial de sustitución de la resina. La funcionalización de la resina (nmol de aa/g de resina), se determina mediante el cálculo de la absorbancia del grupo protector de aminas, Fmoc, que tiene un máximo característico en el espectro de ultravioleta (UV) a 290 nm.

Para poder calcular el número de Fmoc presentes por UV, se necesita una concentración de aproximadamente 0,3 mg/mL. Para ello se recoge en un matraz aforado la solución de piperidina tratada con la resina y se realiza una dilución 1/50, enrasando con dimetilsulfóxido.

Se mide la absorbancia por triplicado en un espectrofotómetro, realizando la lectura a 290 nm. La funcionalización se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$Z = (A \times V) / 1 \times \xi \times Y$$

Los equivalentes de Fmoc-L-Lys (Boc)-OH se disuelven en diclorometano con el volumen mínimo necesario y se adicionan a la resina aplicando agitación continua.

Se añaden 0,7 x 5 equivalentes de N-etildiisopropilamina (DIEA), primero 1/3 del total agitando durante 5 minutos y posteriormente se añade 2/3 del total dejándolo reaccionar durante 40 minutos con agitación constante.

Pasado este tiempo, se procede al bloqueo de los posibles grupos Cl libres que hayan quedado en la resina mediante la adición de metanol, dejándolo reaccionar con agitación durante 10 minutos. La relación del volumen de metanol es de 0,8 mL por cada gramo de resina. Pasado este tiempo se filtra la mezcla.

Se lava nuevamente con diclorometano realizando 5 lavados de 1 minuto cada uno de ellos, filtrando el disolvente después de cada lavado.

• **Paso 3:** Eliminación del grupo Fmoc. La cadena peptídica se va incrementando de manera secuencial por el grupo amino en α (protegido con el Fmoc). Después de la incorporación completa del primer aminoácido, el α -N-protegido del residuo incorporado es eliminado por una solución de desbloqueo ortogonal con el fin de no afectar ni al enlace peptídico de resina, ni a los grupos protectores de la cadena lateral.

Por cada incorporación de un residuo Fmoc-L-Lys (Boc)-OH se procede a la eliminación del grupo Fmoc para dejar libre el grupo α -amino, de esta manera se produce el crecimiento de la cadena peptídica. Para ello se realizan tratamientos de la resina con una solución piperidina al 20% en DMF (N, N'-dimetilformamida), un primer lavado de 2 minutos, y 2 lavados posteriores de 10 minutos cada uno, filtrando el disolvente después de cada lavado. Se lava con DMF, realizando 5 lavados de 1 minuto, filtrando el disolvente después de cada lavado.

• **Paso 4:** Procedimiento general de incorporación de Fmoc-L-Lys (Boc)-OH en el resto de la secuencia. Se pesan 3 equivalentes de Fmoc-L-Lys (Boc)-OH calculados a partir de la sustitución real de la resina, conocida una vez realizado el primer acoplamiento. Se disuelven en la mínima cantidad de DMF.

Paralelamente se pesan 3 equivalentes de HOBt y se disuelven también en la mínima cantidad de DMF. Se adicionan ambas soluciones a la resina. A continuación, se añaden a la resina 3 equivalentes de N, N'-diisopropilcarbodiimida (DiPCDI). Se agita de forma continua durante 1 hora 30 minutos. Se lava con DMF, realizando 5 lavados de 1 minuto, filtrando el disolvente después de cada lavado. Se lava con diclorometano, realizando 5 lavados de 1 minuto, filtrando el disolvente después de cada lavado.

De esta manera se obtiene un segmento de péptido de cadena lateral protegida anclado a la resina y que contiene sólo una amina primaria libre nucleófila, sobre el que los próximos aminoácidos se acoplan.

Siguiendo este procedimiento se incorporarán como esteres activos, paso a paso el resto de las lisinas.

Este proceso de eliminación del grupo Fmoc e incorporación de Fmoc-L-Lys (Boc)- OH, se repite hasta tener los 8 residuos de octalisina incorporados. Al introducir el octavo aminoácido elimina el grupo Fmoc, proceso descrito en el paso 5, con el fin de obtener la octalisina (Boc) con el grupo amino en α libre.

• **Paso 5:** Obtención de octalisina (Boc), mediante una rotura acidolítica de la octalisina- ClTrt-resina. Se lava la resina previamente con diclorometano y se filtra una vez haya aumentado de volumen. Se realizan 5 tratamientos con una disolución de diclorometano al 1% en ácido trifluoroacético (TFA), de 30 segundos cada tratamiento. Se filtra cada vez que se realiza un tratamiento, recogiendo los disolventes filtrados. Se realiza una evaporación para eliminar el ácido trifluoroacético y el diclorometano.

• **Paso 6:** Tras el último acoplamiento de lisina, se obtiene la secuencia completa protegida en la resina. Un tratamiento posterior acidolítico (ácido trifluoroacético al 95% en agua), escinde el enlace peptídico de la resina y elimina los grupos protectores de la cadena lateral, obteniéndose de esta manera el crudo de reacción de la octa L-lisina. En la Figura 32 se describe el proceso de síntesis de la octalisina.

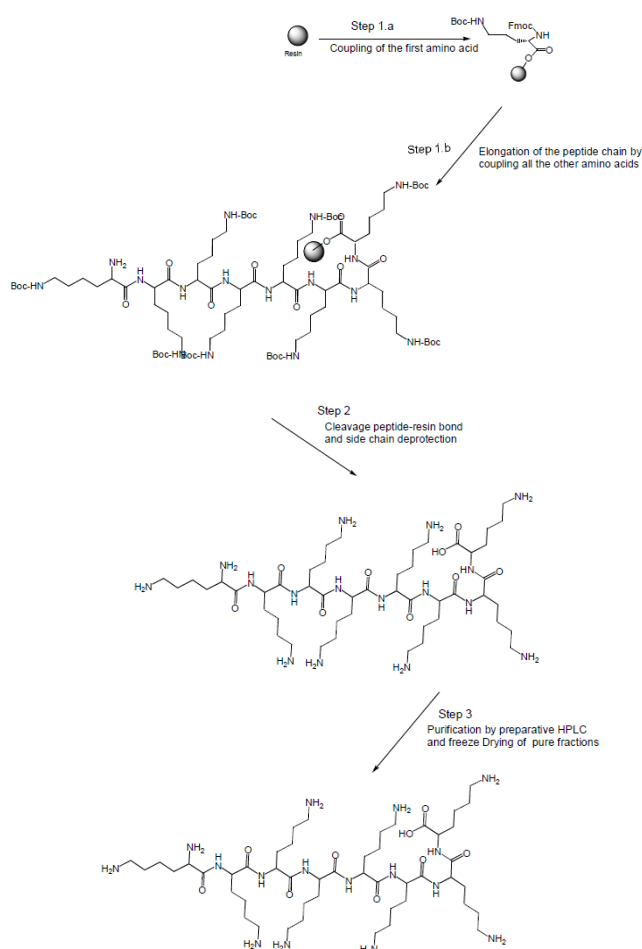


Figura 32. Esquema de síntesis de octalisina.

1.3 Amoxiciloil octa L-Lisina (APL)

1.3.1 Síntesis de amoxiciloil octa-L-lisina

Con el objeto de establecer el método óptimo de colmación, se realizan varias pruebas con la octalisina y diferentes condiciones en relación a la cantidad de: equivalentes de amoxicilina, tiempos de reacción y purificación. Se resumen en la Tabla 9.

Material de partida	Escala (mg)	Tiempo	Comentarios
Amoxicilina Octalisina (100 eq)	240 mg 10mg	3h	Se filtra en una célula ultrafiltración con un filtro de 5000 Da y se liofiliza durante 4 días. Mayoritario la hepta-amida
Amoxicilina Octalisina (100 eq)	2.4 gr 100 mg	6h	Filtrado 5000 Da y liofilizado 4 días. Mayoritario la hepta-amida.
Amoxicilina Octalisina (50 eq)	1.9 gr 100 mg	6h	Filtrado 5000 Da y liofilizado 4 días. Mayoritario la hexa-amida (60%)
Amoxicilina Octalisina (20 eq)	372 mg 50 mg	6h	Filtrado 5000 Da y liofilizado 4 días. Hexa y heptaamida (1:1)
Amoxicilina Octalisina (200 eq)	7.4 gr 100 mg	6h	Filtrado 5000 Da y liofilizado 4 días. Mayoritario la hepta-amida.

Tabla 9. Esquema con las diferentes pruebas realizadas de colmatación de la octalina y la amoxicilina sódica.

De estos resultados, se desprende que utilizando al menos 100 eq de Amoxicilina se obtiene mayoritariamente el conjugado unido a siete restos de amoxiciloico. Todos estos ensayos sirvieron de antesala, para el desarrollo de la síntesis definitiva de la molécula de APL.

El método de colmatación y síntesis de la Amoxiciloil octa L-lisina ($C_{176}H_{250}N_{40}O_{49}S_8$) se ha realizado conforme al protocolo de trabajo que se describe a continuación:

1) Disolución de Amoxicilina sódica y octa L-Lisina: Se pesan 18,6 gramos de Amoxicilina sódica, que se disuelven en 100 mL de tampón K_2HPO_4/KH_2PO_4 0,1 M, a un pH de 11,5 utilizando NaOH 1 M para ajustar la disolución. Se añade 1 g de octa L-Lisina manteniendo el pH ajustado a 11,5.

La disolución se mantiene en agitación suave durante 16 h, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente se ajusta el pH con HCl 10 M hasta obtener un pH de 3,5, rango en el cual se inicia la formación de un precipitado blanco (pH cercano a 4,5).

2) Centrifugación y Filtración: Una vez alcanzado el pH de 3,5, el contenido obtenido se centrifuga a 4°C, durante 20 minutos a 8000 rpm. El seguimiento de este proceso se realiza por HPLC. El sólido obtenido es una mezcla de Amoxiciloil octa L-lisina (APL), amoxiciloil hepta L-lisina (A7PL), amoxiciloil nona L-lisina (A9PL), Amoxicilina de partida y derivados de la degradación de la Amoxicilina: ácido amoxiciloico y diceptopiperacina.

Para eliminar parte de las moléculas obtenidas, el sedimento se resuspende en 75 mL de metanol frío y se somete a sonicación durante 5 minutos, y posterior centrifugación a 4°C, durante 20 minutos a 8000 rpm. Este mismo proceso se repite posteriormente dos veces más. Ambos sedimentos obtenidos se filtran.

3) Liofilización: Se emplea un liofilizador Virtis Génesis Super 25L ultra ES/53.

4) Purificación: Se obtiene un producto sólido y mediante HPLC semipreparativo con detector de UV, se realizó un proceso de purificación cuyo objetivo es descartar el conjunto de moléculas que no sean APL. Se realizó en las siguientes condiciones;

- Equipo: HPLC Waters 2767 inyector-colector y Waters 2489 detector UV/Visible.
- Columna: ACE 5 μm C18-PFP 100 x 21,2 mm.
- Flujo: 16 mL/min.
- Longitud de onda: 220 nm.
- Volumen de inyección: 990 μL
- Fase móvil: A.- H₂O + 0,1% TFA
B.- ACN + 0,1% TFA
- La elución se realiza en gradiente según la Tabla 10.

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
2,00	83	17
9,00	81	19
9,10	80	20
11,50	79	21
12,00	77	23
15,00	75	25
17,00	0	100
18,00	95	5
18,30	95	5

Tabla 10. Gradiente empleado en el ensayo de purificación.

- Muestra: se pesan 30 mg del producto sólido blanco obtenido en el apartado de liofilización. Se disuelven en 950 μL de la mezcla DMSO/ACN en proporción (8:2) y sobre la que se añade 50 μL de TFA, hasta su completa disolución por ultrasonidos, filtrándose antes de inyectar por filtros de tamaño de poro de 0,45 μm .

Se consideran puntos clave del proceso y que requieren especial atención de análisis, los siguientes pasos:

- El sobrenadante obtenido tras el proceso de centrifugación.
- Muestra representativa del sólido de reacción obtenido.
- Cada una de las fracciones obtenidas a lo largo del proceso de purificación, para determinar la riqueza en APL. Aquellas fracciones purificadas que presenten una riqueza superior al 98%, se agrupan y posteriormente se someten a una segunda liofilización

Las muestras obtenidas en los puntos mencionados anteriormente, se analizan con el método analítico que se describe a continuación:

- Equipo: HPLC Waters 2695 separations module y Waters 2489 UV/Visible detector.
- Columna: ACE C18-PFP 3 μm 4,6 x 75 mm.
- Flujo: 1,0 mL/min.

- Longitud de onda: 220 nm
- Volumen de inyección: 30 μ L
- Fase móvil: A.- H₂O + 0,1% TFA
B.- ACN + 0,1% TFA
- La elución se realiza en gradiente según la Tabla 11:

Tiempo (min)	%A	%B
0	95	5
7,00	60	40
7,50	0	100
10,50	0	100
11,00	95	5
13,00	95	5

Tabla 11. Gradiente empleado en el ensayo de valoración de pureza.

- Muestra: se pesan 4,0 mg del producto sólido blanco obtenido en el apartado de liofilización. Se disuelve la muestra en 10,0 mL de una disolución formada por un 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) en H₂O, hasta su completa disolución por ultrasonidos, filtrándose antes de inyectar por filtros de tamaño de poro de 0,45 μ m.

5) Liofilización: Las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación, se liofilizan para su conservación en el mismo liofilizador Virtis Génesis Super 25L ultra ES/53.

Las Figuras 33 y 34 muestran el esquema de la síntesis y purificación:

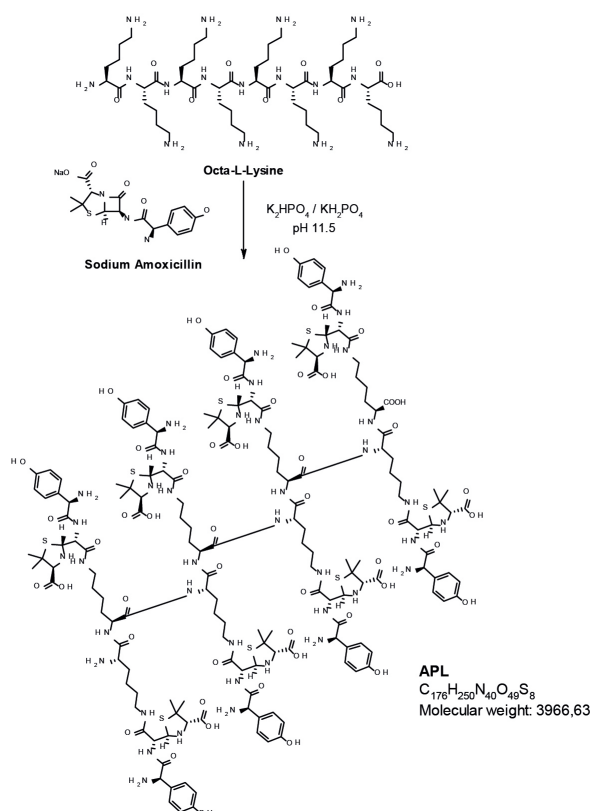


Figura 33. Esquema de síntesis de Amoxiciloil octa L-lisina. Resultado de la unión de 8 cadenas de lisinas unidas cada una de ellas a un resto amoxiciloico.

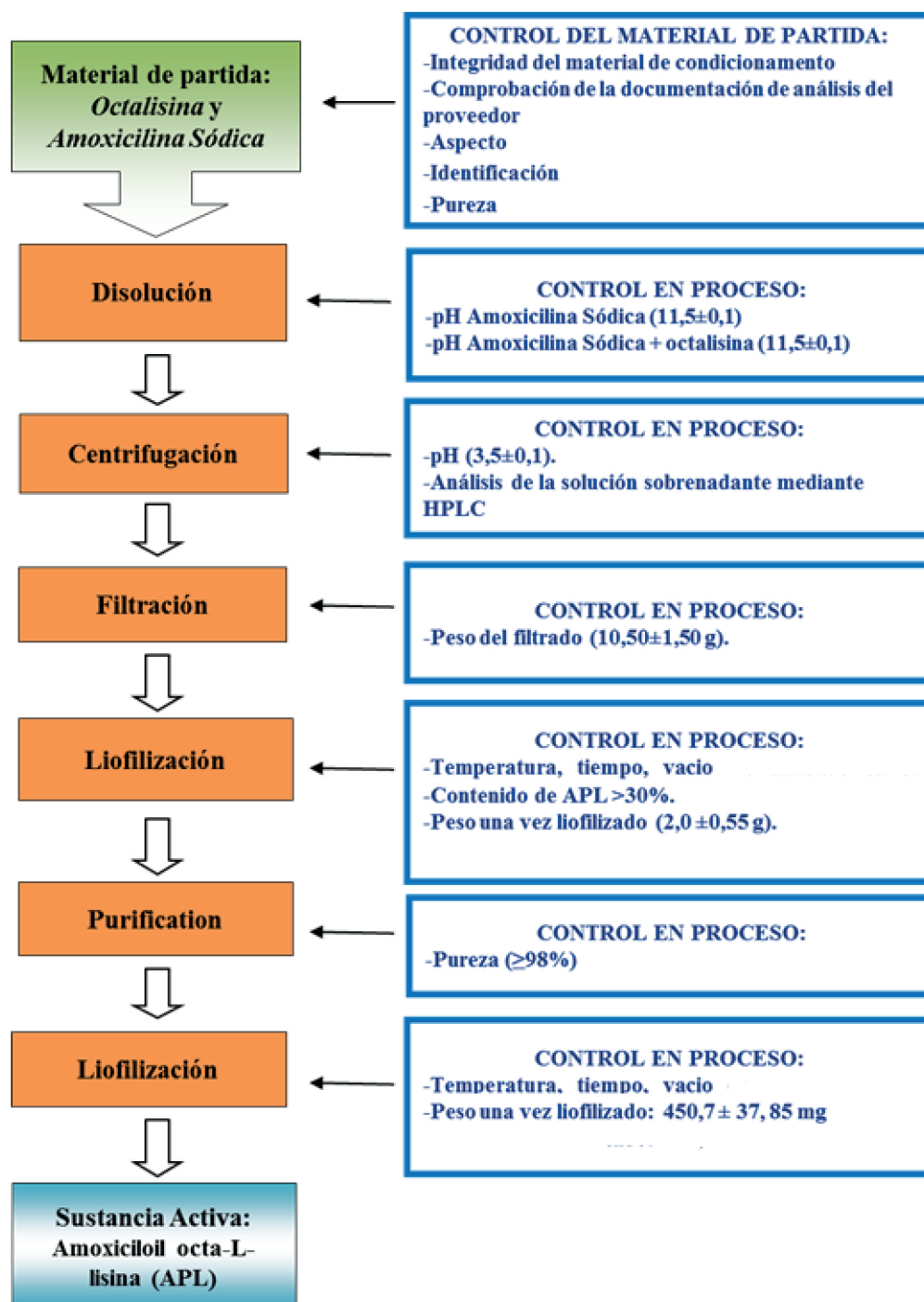


Figura 34. Esquema del proceso de síntesis de Amoxicilol octa L-lisina. Descripción de los pasos y controles realizados a lo largo del protocolo de síntesis.

1.3.2 Caracterización de amoxiciloil octa L-Lisina (APL)

Tanto la identificación y valoración de la molécula de APL, como la identificación y valoración de impurezas (conocidas y desconocidas de APL) se realizan mediante métodos analíticos por HPLC. Los cuales previamente se han puesto a punto y validado siguiendo las directrices dadas en la “ICH-Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95)”. Los parámetros correspondientes a linealidad, exactitud, selectividad, precisión, rango e idoneidad del sistema, se describen a continuación.

En los distintos estudios de validación que se han llevado a cabo durante este trabajo se han aplicado y calculado los siguientes parámetros:

- **Linealidad:** es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. Se expresa como el coeficiente de correlación de los datos que componen la recta obtenida por regresión lineal. Concretamente, se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson, con una significación estadística de 0,05.

- **Exactitud:** traduce la concordancia entre el valor convencionalmente aceptado como verdadero o valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado. Es una medida de aproximación que se verifica entre los resultados obtenidos y el valor real. Se expresa a través del porcentaje de recuperación, acompañado del intervalo de confianza para un 95%.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{Concentración analito obtenida}}{\text{Concentración analito real}} \times 100$$

- **Selectividad:** es la capacidad para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra. Se observó visualmente en los cromatogramas la ausencia de interferencias en las condiciones habituales del ensayo.

- **Precisión:** El objeto es conocer la variabilidad del método de ensayo. Se analiza a través del Coeficiente de Variación (C.V.).

- Repetibilidad del sistema: Se realizan 10 medidas repetitivas sobre una misma muestra.

- Repetibilidad del método: Se determina el grado de acercamiento entre una serie de medidas obtenidas por análisis múltiple de una misma muestra homogeneizada, bajo las mismas condiciones operativas y durante un corto periodo de tiempo. Para ello, se realizaran un mínimo de 6 determinaciones de la concentración del principio activo en el método.

- Precisión intermedia: Se determina el grado de acercamiento entre una serie de medidas obtenidas por análisis múltiple de una misma muestra homogeneizada, habiendo realizado alguna variación tal como; día, analista, equipo, etc....(no siendo necesario estudiar cada una de estas variables individualmente).

• **Rango:** Es el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito.

• **Idoneidad del sistema:**

• Factor de Asimetría (AS) (también llamado factor de coleo): El valor del factor de simetría debe estar comprendido entre 0,80 y 1,50. (Ph. Eur. 8,7 Edición, 01 abril 16).

$$As = W_{0.05}/2d$$

• Nº de platos teóricos (N): Será calculado, cuando el pico eluya en condiciones isocráticas, de acuerdo a la formula abajo indicada (Ph. Eur. 8,7 Edición, 01 abril 16). Se realizan tres inyecciones y se calcula sobre la media.

$$N = 5,54 (tR/Wh)^2$$

tR= Designa el tiempo de retención o la distancia en milímetros, sobre la línea base entre el punto de inyección y la perpendicular trazada desde el máximo del pico correspondiente al componente.

Wh= Designa la anchura del pico en la mitad de su altura, en milímetros.

Para poder interpretar los datos obtenidos y compararlos con los criterios de aceptación, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (C.V.) para las replicas de las analíticas realizadas.

$$C.V. = \frac{\text{desv. est.}}{\text{media}} \times 100$$

Para las validaciones se han utilizado la siguiente relación de estándares y patrones internos:

- Amoxicilina Sódica, según Ph. Eur. 8,7 Edición, 01 abril 16.
- Dicetopiperacina, según Ph. Eur. 8,7 Edición, 01 abril 16.
- Ácido amoxiciloico, según Ph. Eur. 8,7 Edición, 01 abril 16.
- Estándares internos de Amoxiciloil - Octa-L-Lisina.

1.3.2.1 Valoración de pureza y sustancias relacionadas de amoxiciloil octa L Lisina

El análisis de la molécula de APL se realiza mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC Waters 2695 separations module y Waters 2489 UV/Visible detector.

Preparación de las muestras para la determinación de la pureza: Valoración de principio activo

Solución estándar: Se pesan 4,0 mg de un estándar de la molécula de APL y se disuelve en 10,0 mL de una disolución formada por ACN/H₂O (1:1). Tras agitación suave, el vial se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos hasta su completa disolución. Antes de su inyección las muestras disueltas se pasan por filtros de tamaño de poro de 0,45 µm.

Solución problema: Se pesan 4,0 mg del producto sólido blanco obtenido y se disuelve en 10,0 mL de una disolución formada por ACN/H₂O (1:1). Tras agitación suave, el vial se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos hasta su completa disolución. Antes de su inyección las muestras disueltas se pasan por filtros de tamaño de poro de 0,45 µm.

Condiciones cromatográficas

- Equipo: HPLC Waters 2695 separations module y Waters 2489 UV/Visible detector.
- Columna: ACE C18-PFP 3 µm 4,6 x 75 mm.
- Flujo: 1,0 mL/min.
- Longitud de onda: 220 nm.
- Volumen de inyección: 10 µL.
- Fase móvil: A.- H₂O + 0,1% TFA
B.- ACN + 0,1% TFA
- La elución se realiza en gradiente según la Tabla 12:

Tiempo (min)	%A	%B
0	95	5
7,00	60	40
7,50	0	100
10,50	0	100
11,00	95	5
13,00	95	5

Tabla 12. Gradiente empleado en el método de valoración de principio activo

El cálculo de principio activo se realiza según la fórmula que se indica a continuación, siendo el % de principio activo igual a:

$$\%Pac = [(área\ problema/área\ estándar) \times (concentración\ estándar) / (concentración\ muestra)] \times 100.$$

Preparación de las muestras para la determinación de la valoración de sustancias relacionadas: impurezas conocidas y desconocidas

Solución estándar para impurezas conocidas: Ácido amoxiciloico, Amoxicilina sódica y Dicetopiperacina al 1%: Se pesan 4,0 mg del estándar de Ácido amoxiciloico, 4,0 mg del estándar de Amoxicilina sódica, y por último 4 mg del estándar de Dicetopiperacina. Todas las pesadas se disuelven en el mismo matraz con 10,0 mL con una mezcla compuesta por H₂O/ACN (8:2), la concentración obtenida en este matraz es de 0,4 mg/ mL. Tras agitación suave, se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos hasta su completa disolución. De esta disolución se retiran 100 µL que se trasvasan a un nuevo matraz, disolviéndose estos 100 µL con una mezcla compuesta por H₂O/ACN (8:2), enrasando dicha disolución hasta 10,0 mL. Antes de su análisis por HPLC, las muestras disueltas se pasan por un filtro de tamaño de poro igual a 0,45 µm. La disolución así preparada presenta una concentración de 0,004 mg/mL de los tres estándares; Ácido amoxiciloico, Amoxicilina sódica, y Dicetopiperacina.

Solución estándar para impurezas desconocidas: Se pesan 4,0 mg de Amoxiciloil octa L-Lisina y se disuelven en un matraz con 10,0 mL con una mezcla compuesta por H₂O/ ACN (8:2). Tras agitación suave, se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos hasta su completa disolución. Se toman 200 µL de esta disolución se trasvasan a un matraz de 10,0 mL, enrasando con el mismo disolvente. Las muestras disueltas se pasaron por un filtro de tamaño de poro 0,45 µm.

Solución problema: Se pesan 4,0 mg del producto sólido blanco obtenido y se disuelven en 10,0 mL de una mezcla compuesta por ACN/H₂O (1:1). Tras agitación suave, se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos hasta su completa disolución. Antes de análisis por HPLC, las muestras disueltas se pasan por un filtro de tamaño de poro igual a 0,45 µm.

Condiciones cromatográficas: Se emplean las mismas condiciones descritas en el apartado 1.1.3.1.1 Identificación y valoración de la molécula de APL, salvo para el volumen de inyección es de 90 µL.

Cálculo de impurezas: Se calcula el % de cada una de las impurezas de acuerdo a la siguiente relación/fórmula:

% **Dicetopiperacina**= (Área Dicetopiperacina problema/ Área Dicetopiperacina estándar) x 100

% **Ácido Amoxiciloico** = (Área Amoxiciloico problema/ Área Amoxiciloico estándar) x 100

% **Amoxicilina**= (Área Amoxicilina problema/ área Amoxicilina estándar) x 100.

% **Impurezas no identificadas**= (Área Impurezas desconocidas problema/ Área APL estándar de impurezas desconocidas) x 100.

1.3.2.2 RMN resonancia magnética nuclear de Amoxiciloil octa L-Lisina

La determinación estructural de la molécula de APL, por resonancia magnética se realizó mediante análisis de ¹H-RMN de protón y TOCSY (correlación de análisis protón-protón). El equipo utilizado es un Bruker 600 MHz. La muestra se preparó pesando 0,5 mg de Amoxiciloil octa L-lisina y posterior disolución en 150 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*⁶).

El campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación (rf) excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el corto pulso de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín).

A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial. Se recogió esta intensidad respecto al tiempo y se convirtieron dichos datos en intensidad respecto a frecuencia.

Los desplazamientos químicos se expresaron en parte por millón (ppm, δ) referidos al pico residual del disolvente.

1.3.2.3 IR: Infrarrojos de Amoxiciloil octa L-Lisina

El objetivo de esta técnica fue corroborar la identificación de la molécula de Amoxiciloil octa L-lisina, utilizando para ello las señales características de los grupos funcionales que aparecen en la misma. El equipo utilizado ha sido Thermo Nicolet Nexus Fourier-Transform Infrared Espectrofotómetro (FT-IR).

La muestra se preparó mezclando 5 mg exactamente pesados de la molécula de APL con 50 mg de bromuro de potasio (KBr).

1.3.2.4 Determinación del contenido en agua de Amoxiciloil octa L-lisina

La determinación del contenido de agua se realizó con un coulómetro Karl Fisher C20 (Mettler).

El procedimiento se realizó pesando 10 mg de la muestra, y midiendo en el equipo coulómetro Karl Fischer C20 en el programa adecuado, con los reactivos Hydranal Coulomat AG e Hydranal Coulomat CG. El experimento se realizó por triplicado.

1.3.2.5 Contenido de disolventes residuales de Amoxiciloil octa L-lisina

La metodología empleada se refiere a la determinación del acetonitrilo que es un (disolvente clase 2), fue la descrita en la Farmacopea Europea 8,7. Método 5.4 disolventes residuales.

1.3.2.6 Perfil de estabilidad de Amoxiciloil octa L-lisina

La estabilidad se establece en base a lo descrito en las directrices “Note for guidelance on Stability Testing: Stability of New Drug substance and Products ICH Topic Q1A (R2) (CPMP/ICH/2736/99)”, en las siguientes condiciones de temperatura y humedad:

- $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\% \text{HR}$: conservación a largo plazo, cuyas condiciones de conservación a tiempo intermedio son $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65 \pm 5\% \text{HR}$ y las condiciones aceleradas $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{HR}$.
- $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ cuyas condiciones de conservación aceleradas son $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5 \text{HR}$.

La frecuencia de los análisis se muestra en la Tabla número 13:

Almacenamiento	Estudio	Intervalo entre los análisis				
		0	3	6	9	12
Condiciones de almacenamiento						
$5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	Largo plazo/acelerado					
$25 \pm 2^{\circ}\text{C}/60 \pm 5\% \text{HR}$	Largo plazo/acelerado					
$30 \pm 2^{\circ}\text{C}/65 \pm 5\% \text{HR}$	Intermedio					
$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\% \text{RH}$	Acelerado					

 Período sin análisis

Tabla 13. Frecuencia de análisis durante el estudio de estabilidad.

2. Ensayo de perfil de seguridad en animales de Amoxiciloil octa L-lisina

Se realizaron dos estudios; *un primer estudio de dosis máxima no irritante*, para asegurar que la dosis diagnóstica que se vaya a obtener en el ensayo clínico de la molécula de APL esté por debajo de la dosis irritante, a fin de que no se invalide su capacidad diagnóstica.

El segundo *estudio de toxicidad fue a dosis repetidas*, éste se realizó una vez obtenida la dosis máxima no irritante. Su finalidad es asegurar que las respuestas de aumento de pápula obtenidas en el ensayo clínico, son debidas a la respuesta IgE mediada tipo I y no a una irritación no específica.

2.1 Toxicidad aguda: Dosis máxima no irritante

Se realizó el estudio para determinar la concentración máxima no irritante (MNIC) para la molécula de APL, tras su administración intradérmica. Se emplearon ratas (Sprague Dawley), conforme al protocolo establecido OCDE ("Guidelance for the Testing of Chemicals. Test N° 404"), el cual se recoge en las Tablas 14, 15, 16.

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA: MATERIAL ANIMAL	
Especies	Ratas
Raza	Sprague Dawley
Sexo	Femenino y Masculino
Color	Albino
Proveedor	Charles River
Estado de salud	Libre de patógenos específicos
Total de animales	36 machos 36 hembras
Peso aproximado a la llegada de los animales	225-275 g \pm 25
Criterios de inclusión en la llegada	Inspección veterinaria y \pm 20% de la media del peso corporal.
Periodo de aclimatación	Al menos 5 días.
Dieta de los animales	Dieta global; ad libitum

Tabla 14. Características del sistema: Descripción de los animales que han participado en el estudio.

INSTALACIONES	
Localización	Vivotecnia Research
Autoridad acreditada	Dirección General de Agricultura, Comunidad de Madrid (ES 289030000025)
Leyes que aplican	Directiva Europea 86/609/EEC/2010/63/EC Leyes Españolas RD 1201/2005
Ciclos de luz	12:12, 07.00 a 19.00 CET
Intercambios de aire	> 15 cambios por hora.
Gradiente de presión	Cámaras de conservación, presión positiva.
Temperatura	22 ± 2°C
Rango de humedad relativa	30-70%

Tabla 15. Instalaciones de los animales. Los datos de temperatura, humedad, presión están archivados en Vivotecnia.

CARACTERÍSTICAS DEL RECINTO ANIMAL	
Superficie de la jaula	1815 cm ²
Tamaño de la jaula	590x390x200 mm
Tapas de la jaula	Malla de alambre de acero inoxidable
Material de la jaula	Policarbonato
Cambios de la jaula y cama	Al menos una vez por semana y cuando se considere necesario durante todo el período del estudio.
Animales por jaula	4-5

Tabla 16. Recinto en el permanecieron los animales durante el estudio.

El ensayo consta de dos partes: un primer estudio inicial a fin de establecer la concentración máxima no irritante (MNIC), y una parte confirmatoria en la que se utilizará la dosis obtenida en la parte inicial.

Para ello, se administran tres concentraciones crecientes de la molécula de APL 0,05; 0,1; y 1 mg/mL por vía intradérmica a 2 hembras. Cada concentración se administra en un punto diferente del lomo de los animales. Una vez transcurrido el tiempo se inoculan bajo las mismas condiciones otras tres concentraciones crecientes de Amoxiciloil octa L-Lisina (APL); 5; 10 y 20 mg/mL a otras dos hembras, por vía intradérmica.

Se realizó una inyección por dosis, animal y área preseleccionada del dorso del animal, siendo el número total de inyecciones por animal de 3.

Una vez determinada la MNIC, se procedió a realizar el estudio de confirmación de la dosis no irritante, obtenida en el ensayo anterior. Para ello, se inyectan por vía intradérmica a 5 hembras y 5 machos, en tres puntos diferentes del dorso con la MNIC seleccionada en el ensayo anterior.

La administración fue una única inyección de la MNIC seleccionada por animal en cada área preseleccionada del dorso del animal, siendo el número total de inyecciones por animal de 3.

La Tabla 17 describe número de animales, concentraciones y volúmenes de dosis de las fases (inicial y confirmatoria) que constituyen el protocolo:

Ensayo	Vía administración	Volumen dosis (μL/sitio)	Concentraciones ensayadas (mg/mL)	Número de animal ^b	Sexo	Peso
Inicial	Intradermo	50	0,05	1-2	Hembra	250 ± 25 g
			0,1			
			1			
			5	3-4 ^a		
			10			
			20			
Confirmatoria	Intradermo	50	MNIC	5-9	Hembra	
			(la calculada)	10-14	Macho	

Tabla 17. Descripción del número de animales, concentraciones y volúmenes de dosis empleados en el estudio de la concentración máxima no irritante (MNIC). ^a Si el efecto no irritante se observó después de la administración de las concentraciones 0,05, 0,1 y 1 mg/mL: los animales 3 y 4 fueron reinyectados tres días después con las concentraciones 5, 10 y 20 mg/mL. ^b Todos los animales fueron además administrados de manera similar con el control.

Tras la administración, el período de observación fue de 14 días, una vez concluido el estudio los animales fueron sacrificados. Durante este tiempo las reacciones cutáneas observadas en cada una de las diferentes concentraciones testadas, fueron clasificadas y registradas, como irritantes o no irritantes de acuerdo a los criterios establecidos en la escala OECD y descritos a su vez en la Tabla 17.

La presencia de eritemas y/o edemas, y otros efectos locales en el lugar de la inyección, fue

evaluada individualmente cada 30 minutos, 1, 2, 4, y 6 horas tras cada una de las administraciones y diariamente hasta el final del período de observación (14 días).

Clasificación de las reacciones de la piel

Los eritemas y edemas fueron clasificados según la siguiente escala (“OECD guidelance N°404”), Tabla 18:

Eritema	Grado	Edema	Grado
No eritema	0	No edema	0
Muy escaso eritema (apenas perceptible)	1	Muy escaso edema (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2	Escaso edema (borde de área bien definido)	2
Moderado a severo eritema	3	Edema moderado (incrementado 1 mm)	3
Eritema severo (músculo enrojecido)	4	Edema severo (incrementado más de 1 mm, extendido más allá del área de exposición)	4
Máximo posible	4	Máximo posible	4

Tabla 18. Escala de eritemas y edemas según “OECD guidelance

Otras lesiones de la piel que pueden aparecer son alopecia, hiperqueratosis o pérdida de grasa de la piel, las cuales también fueron consideradas y registradas.

De forma simultánea se controlan los siguientes parámetros

- Signos clínicos/Mortalidad: Mortalidad, signos clínicos como cambios en la piel, ojos, mucosas, alteraciones en la respiración y en el comportamiento, movimientos anormales. Los animales eran observados diariamente hasta el día del sacrificio. El primer día se han realizado numerosas observaciones repetidas hasta 6 horas después de la administración de la dosis.
- Peso: fue controlado a la llegada de los animales, antes de la primera dosis, y semanalmente hasta sacrificio de los mismos.

2.2 Toxicidad subaguda

Se realizaron estudios de toxicidad subaguda, local y sistémica de la molécula de APL. Se llevaron a cabo en ratas machos y hembras (Sprague Dawley). Tres administraciones intradérmicas repetidas intermitentemente, con períodos de 29 días (día 1, 15 y 29), a una concentración de 0,5 mg/mL, volumen de administración de 120 µl por dosis/día (administrando en 4 diferentes áreas 30 µl/sitio) conforme al protocolo establecido “OCDE: Guidelance for the Testing of Chemicals. Test N° 404”. El cual se refleja en las Tablas 19, 20, 21.

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA: MATERIAL ANIMAL	
Especies	Ratas
Raza	Sprague Dawley, ratas comunes usadas en toxicología
Sexo	Femenino y Masculino
Color	Albino
Proveedor	Charles River
Estado de salud	Libre de patógenos específicos
Total de animales	5 machos y 9 hembras
Edad aproximada del animal	8 semanas.
Peso aproximado a la llegada de los animales	225-275 g \pm 25
Criterios de inclusión en la llegada	Inspección veterinaria.
Período de aclimatación	Al menos 5 días.
Dieta de los animales	Dieta global; ad libitum

Tabla 19. Características del sistema: Descripción de los animales que han participado en el estudio.

INSTALACIONES	
Localización	Vivotecnia Research.
Autoridad acreditada	Dirección General de Agricultura, Comunidad de Madrid (ES 289030000025).
Leyes que aplican	Directiva Europea 86/609/EEC/2010/63/EC. Leyes Españolas RD 1201/2005.
Ciclos de luz	12:12, 07.00 a 19.00 CET.
Intercambios de aire	> 15 cambios por hora.
Gradiente de presión	Cámaras de conservación, presión positiva.
Temperatura	22 \pm 2°C
Rango de humedad relativa	30-70%

Tabla 20. Instalaciones de los animales. Los datos de temperatura, humedad, presión están archivados en Vivotecnia

CARACTERÍSTICAS DEL RECINTO ANIMAL	
Superficie de la jaula	800 cm ²
Tamaño de la jaula	425x266x185 mm
Tapas de la jaula	Malla de alambre de acero inoxidable
Material de la jaula	Policarbonato
Cambios de la jaula y cama	Al menos dos veces por semana y cuando se considere necesario durante todo el período del estudio.
Animales por jaula	3

Tabla 21. Recinto en el permanecieron los animales durante el estudio

Los animales se distribuyeron en 2 grupos formados cada uno por 6 machos y 6 hembras:

- A) Grupo control tratados con tampón fosfato (control negativo) Vehículo.
- B) Grupo experimental tratados con Amoxiciloil octo L-lisina (APL). Recibieron 120 µL (inyectados en 4 sitios diferentes, 30µL/sitio) a una concentración de 0,5 mg/mL.

Para evaluar los potenciales efectos tóxicos, los grupos A y B, se subdividen a su vez en Principal y Recuperación. Los animales asignados al grupo principal se sacrifican el día 30 mientras que los asignados al grupo de recuperación se mantienen durante un período de 2 semanas tras la tercera administración (día 29) para evaluar la reversibilidad, persistencia u otros efectos adversos eventuales.

Así pues la duración del estudio es de 30 días para el grupo principal, y de 44 días para el grupo de recuperación.

Los parámetros evaluados en ambos grupos han sido; mortalidad, signos locales y generales clínicos, peso corporal y consumo de alimentos, además de observar y registrar caracteres patológicos y clínicos durante las semanas 4 y 6 del estudio. La evaluación de la seguridad, incorpora así mismo la evaluación histopatológica (bazo, timo, mesentérica, escapular y ganglios linfáticos inguinales además de las muestras de la piel).

Los animales fueron distribuidos en dos grupos experimentales, un primer grupo recibió la administración del control (tampón fosfato), y un segundo grupo fue administrado con la molécula de APL. La distribución de los grupos se muestra en la Tabla 22, y las características de la administración en la Tabla 23:

Grupo	Producto	Concentración (mg/mL)	Principal Macho	Hembra	Recuperación Macho	Hembra
A	Tampón fosfato	Mezcla de sales	1-6	19-24	37-42	55-60
B	APL	0,5	7-12	25-30	43-48	61-66

Tabla 22. Distribución de los grupos. A: Grupo control. B: Grupo referencia.

Grupo	Producto	Volumen dosis/día administración		
		Total (µl)	Número de inyecciones/área	Volumen/área (µl)
A	Tampón fosfato	120	4	30
B	APL	120	4	30

Tabla 23. Características de la administración. Volumen de administración por área en el grupo control y de referencia.

Tanto para el grupo control como el experimental, la administración se realizó los días 1, 15, y 29 en las áreas seleccionadas de la espalda afeitada, 48 h previas de acuerdo al esquema que se muestra a continuación:

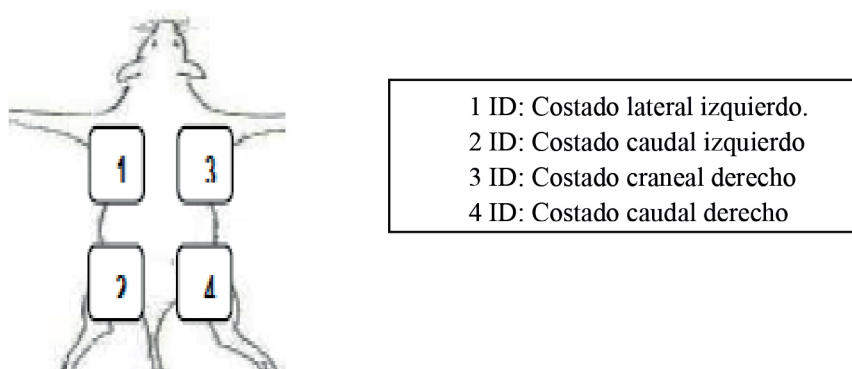


Figura 35. Esquema de las zonas de administración

Valoración

Reacciones locales en la piel

Los días de tratamiento (1, 15 y 29), se evalúa la presencia de eritema y edema. Además se realizan observaciones trascurridos 1, 2, 4 y 6 horas después de la administración de la molécula de APL, pudiendo extenderse el periodo de observación en función de la aparición, duración y gravedad de los signos de toxicidad.

Las reacciones locales fueron registradas inmediatamente para cada una de las inyecciones con el tratamiento que corresponda en cada inyección.

Los eritemas y edemas se clasifican conforme al protocolo ("OECD guideline N° 404"), según se recoge en la Tabla 24;

Eritema	Grado	Edema	Grado
No eritema	0	No edema	0
Muy escaso eritema (apenas perceptible)	1	Muy escaso edema (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2	Escaso edema (borde de área bien definido)	2
Moderado a severo eritema	3	Edema moderado (incrementado 1 mm)	3
Eritema severo (músculo enrojecido)	4	Edema severo (incrementado más de 1 mm, extendido más allá del área de exposición)	4
Máximo posible	4	Máximo posible	4

Tabla 24. Escala de eritemas y edemas según “OECD guideline”.

Otras lesiones de la piel que pueden aparecer son; alopecia, hiperqueratosis o pérdida de grasa de la piel, también quedaron registradas.

Mortalidad y cambios generales clínicos

Los animales fueron observados diariamente para registrar los signos clínicos de malestar y mortalidad hasta el final del período de observación conforme a la “Humane Endpoints Guidance Document of the OCDE”. Las observaciones incluían cambios en la piel, ojos y membranas mucosas. El protocolo indicaba que se registrasen alteraciones en el patrón respiratorio, la conducta, y la posible presencia de movimientos anormales hasta el momento del sacrificio.

Anatomopatología clínica

Las valoraciones hematológicas y los parámetros bioquímicos se realizaron en la semana cuatro (grupo principal) y en la semana sexta (grupo de recuperación), mediante extracción en ayuno de sangre (0,5 y 1,0 mL) con anticoagulantes (EDTA y heparina de litio respectivamente) para pruebas hematológicas y bioquímicas, respectivamente, mediante punción retro orbital en animales anestesiados con isofluorano.

La investigación terminal se realizó el día 30 (grupo principal) y el día 44 (grupo de recuperación), por eutanasia en atmósfera de CO₂. Bazo, timo, y nódulos linfáticos mesentéricos, linfáticos escapular izquierdo, y linfáticos inguinal derecho fueron objeto de evaluación histopatológica, tras ser conservados en tampón neutro de formaldehído al 4%.

Se consideraron además las siguientes variables.

- **Peso corporal:** se registró la ganancia o pérdida del mismo, antes de la administración, semanalmente y antes del sacrificio de los animales.
- **Consumo de comida:** calculada semanalmente por jaula, y estimando un promedio de ingesta por consumo de animal.
- **Signos sistémicos clínicos:** se observa a los animales diariamente, anotando cualquier manifestación de signos que pudiesen presentar los animales.

2.3. Tratamiento estadístico: toxicidad en animales

Se utilizó la media y la desviación estándar para expresar y comparar el peso corporal de los ejemplares, el peso de los órganos extraídos a los ejemplares de ambos grupos y las sustancias analizadas en los diferentes estudios.

Para la comparación entre los distintos grupos que compusieron los ensayos de toxicidad se utilizó un contraste de hipótesis para dos poblaciones no paramétricas, como la prueba U de Mann-Whitney y el análisis de ANOVA para la comparación entre más de dos poblaciones, ambos con un nivel de significación estadística de 0,05.

3. Modelos Celulares: Liberación de histamina (HR)

El protocolo definido por el grupo de referencia “European Network of Drug Allergy (ENDA) de la European Academy of Allergy and Clinical Immunology EAACI” (Romano et al., 2004), define que el diagnóstico de la alergia a β -lactámicos, está basado en las pruebas clínicas, las pruebas cutáneas “in vivo” (“skin prick test” e intradérmicas), los test “in vitro” (liberación de histamina, determinación de IgE, IgG u otros) y la realización de pruebas de provocación (Brockow K et al., 2015).

Manteniendo como premisa este protocolo y con el fin de demostrar la capacidad diagnóstica de la molécula de APL, se realizó como representante de los test “in vitro”, la técnica de liberación de histamina. Es un método fluorométrico, preciso, sensible y automatizado de aplicación en ensayos de alergia “in vitro”.

La técnica de liberación de histamina (HR), cuantifica la liberación específica de éste mediador de los basófilos humanos en sangre a partir de muestras de basófilos sanguíneos de sujetos sensibilizados a un alérgeno directamente o bien indirectamente a partir de basófilos recubiertos de IgE específica a un alérgeno (sensibilización pasiva).

Se trata de una prueba de fluoroenzimoinmunoensayo en placas microtiter en las que los pocillos están recubiertos de fibra de vidrio, de acuerdo al método descrito por Per Stahl Skov y colaboradores (Stahl Skov et al., 1984) que consiste en el uso de sangre heparinizada de un donante sano y el suero de pacientes sensibilizados a un alérgeno de elección, para que una vez puesto éste en contacto con los basófilos de la mencionada sangre, se produzca la consiguiente liberación de histamina.

Los reactivos que se emplean son:

- Tampón de lavado o “Wash buffer” (solución de SDS en agua al 0,4%).
- Reactivo de acoplamiento o “Coupling reagent” (Phtaldialdehído (OPA)).
- Diluyente para el reactivo de acoplamiento (0,05 mol/L de hidróxido sódico (NaOH)).
- Solución de parada “stop solution” (0,59% ácido perclórico (HClO₄)).

- Solución tamponadora (tampón PIPES) cuyo contenido es; 10 mM ácido sulfúrico piperazina-N, N (bis-etano), acetato sódico 140 mM, acetato potásico 5mM, CaCl_2 0,6 mM, MgCl_2 1,1 mM, glucosa 1 mg/mL, HSA 0,3 mg/mL y heparina 15 IE/mL.
- Viales de preparación (IL-3).

3.1 Selección de pacientes

El grupo de estudio incluyó el suero de 19 pacientes con diagnóstico confirmado de reacciones alérgicas inmediatas a la Amoxicilina, en el último año, en el servicio de alergología de 3 Hospitales españoles: Hospital Ramón y Cajal de Madrid, Hospital Cruz Roja de Madrid, Hospital Universitario Regional de Málaga. Además en el ensayo también participó un cuarto centro: Bionand Centro Andaluz de nanomedicina y biotecnología.

Los pacientes incluidos tenían una reacción alérgica que apareció en menos de 1 hora después de la administración de la Amoxicilina y la presencia de IgE sérica específica a la misma.

Se incluyó además la sangre de un grupo control formado por 10 individuos sanos, que habían recibido previamente una dosis terapéutica de Amoxicilina, sin ningún efecto adverso. A estos pacientes se les realizó pruebas de “skin prick test” y se le midió el nivel de IgE en suero frente a la Amoxicilina.

El estudio se llevo a cabo con un total de 29 sueros de pacientes, contando con el consentimiento informado de cada uno de ellos.

3.2 Recopilación, preparación y almacenamiento de las muestras de sangre

Las muestras usadas para la técnica de liberación de histamina, parten de sangre heparinizada que debe ser procesada en un tiempo máximo de 36 horas. Las muestras se almacenan a temperatura ambiente (20-25°C).

La preparación de las muestras de sangre se realizó mediante la técnica:

3.3 Aislamiento y sensibilización pasiva de basófilos con IgE específica

Los basófilos son obtenidos de muestras de sangre heparinizada de un donante sano (no alérgico) y sobre los que se aplica el siguiente protocolo:

- Centrifugación de la muestra de sangre (600g/10 mn), eliminación y reemplazo del suero por “stripping buffer” (NaCl 0,14 M, KCl 0,005 M y ácido láctico 0,0134 M).
- Homogeneización de la muestra.
- Centrifugación (600g/10 mn) de la muestra de sangre, retirada del “stripping buffer” y remplazo por “Pipes buffer”. A continuación se homogeneiza la muestra. Esta operación se realiza 3 veces.
- Adición del suero del paciente al suero sensibilizado en una proporción 1:8 (a cada mL de sangre le añadimos 125 μL de suero) y transferencia al vial de preparación (IL-3).

3.4 Procedimiento

Las placas y reactivos deben de alcanzar una temperatura entre 20-25°C antes de usarse. El protocolo seguido se describe a continuación.

- Añadir 25 µL de alérgeno a diferentes concentraciones o de tampón Pipes por pocillo.
- Añadir 25 µL de sangre dentro de cada pocillo (mantener cubierto).
- Incuba la placa durante 50-60 minutos a 37°C.
- Lavar los pocillos con H₂O (d) 3 veces. Asegurar el secado de la placa.
- Añadir 150 µL de tampón de lavado (wash) en cada pocillo.
- Incubar durante 30 minutos a 37°C. Eliminar el tampón de lavado.
- Lavar los pocillos con H₂O destilada 3 veces. Asegurar el secado de la placa.
- Pipetear 75 µL de “coupling reagent” [OPA] a cada pocillo.
- Incubar exactamente durante 10 mn.
- Detener la reacción añadiendo 75 µL de “Stop solution” [STOP] por pocillo.
- Leer los resultados de la placa en el lector HistaReader.

3.5 Tratamiento estadístico: Liberación de histamina por parte de basófilos

Para los estadísticos descriptivos de la población de estudio se utilizaron la mediana, el rango intercuartílico y el cálculo de proporciones. Se compararon los resultados obtenidos en la cantidad de histamina liberada entre el grupo de pacientes positivos y el grupo de pacientes negativos, utilizando un comparador de dos poblaciones no paramétrico como el test de Mann-Whitney, para una significación estadística de 0,05. Se utilizó el método de correlación de Spearman, para un 95% de nivel de confianza, para comparar los resultados obtenidos con la molécula utilizada para el diagnóstico habitualmente frente a la molécula experimental.

Por último, se calcularon las curvas ROC con el objetivo de encontrar el punto de corte de la técnica idóneo para estimar los indicadores de eficacia correctamente. La curva ROC se construye al representar en el eje de las “X” 1- especificidad frente a la sensibilidad en el eje de las “Y” para cada punto de corte propuesto en el ensayo, para poder calcular el área bajo la curva, cuyo valor máximo será 1. Este valor constituye la prueba diagnóstica perfecta, cuya área estará delimitada por los propios ejes “X” e “Y”.

4. Programa Clínico

Manteniendo el protocolo definido por la ENDA, se realizó como representante de los test “in vivo” un ensayo clínico. Un ensayo de dosis prospectivo, unicéntrico, abierto, y controlado (diagnóstico clínico), para la obtención de la dosis óptima y seguridad de la molécula de APL, para el diagnóstico de alergia a Aminopenicilinas y antibióticos afines mediante pruebas cutáneas.

4.1 Diseño y características principales

El estudio se realizó en el Hospital Universitario Santiago Apóstol de Álava. Siendo el comité ético de investigación clínica implicado el de este centro hospitalario.

Se realizó siguiendo las directrices de la “Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents”.

La resolución favorable por parte de la AEMPS, del ensayo clínico N°EUDRACT 2013- 000455-40 con medicamento con calificación de PEI (N° DE PEI 13-042), se muestra en el anexo I.

Se diseñó un ensayo clínico de Fase II para determinación de la dosis y seguridad de un producto diagnóstico; APL.

El ensayo ha sido prospectivo, unicéntrico abierto y controlado con un método de referencia (diagnóstico clínico).

Unicéntrico.- Hospital Universitario Santiago Apóstol, Álava.

Abierto.- dado que la reacción cutánea esperada tras la administración no puede verse modificada aún cuando el paciente y el médico conozcan el producto administrado. La presencia de pápula fue un parámetro objetivo y medible.

Controlado.- mediante el diagnóstico clínico y solución tampón fosfato como control negativo. El “gold standard” (estándar de oro), se estimó como la presencia o ausencia de enfermedad, a través de la historia clínica, y los test realizados “in vivo” y/o “in vitro”.

4.2 Objetivo

Evaluación y obtención de la dosis óptima de Amoxiciloil-Octa-L-lisina (APL), definiendo como dosis óptima aquella que, siendo segura y bien tolerada, presentó los mejores parámetros que permitieron realizar un diagnóstico cutáneo adecuado de los pacientes con alergia a aminopenicilinas y antibióticos afines.

4.3 Población

El número total de pacientes evaluados fue de 15; pacientes con historia de reacción alérgica inmediata a aminopenicilinas o antibióticos afines, en el año anterior al inicio del reclutamiento, con una historia compatible clínicamente con urticaria y anafilaxia tras un intervalo de reacción de menos de 1 hora tras la toma del medicamento. Los pacientes seleccionados cumplían al menos uno de los criterios siguientes:

- Presencia de IgE específica a Amoxicilina. En caso de que por práctica habitual en la consulta, el paciente se hubiese sometido a esta prueba en el último mes previo al reclutamiento, no se consideró necesario la repetición de la misma.
- Pruebas cutáneas con Amoxicilina positivas, (al menos con una pápula de $\geq 3\text{mm}$ con respecto al control negativo). En caso de que por práctica habitual en la consulta, el paciente dispusiese de estas pruebas realizadas en el último mes previo al reclutamiento, no consideró necesario la repetición de la prueba.

- Si presentando las pruebas anteriores negativas, el paciente presentó prueba de exposición controlada con Amoxicilina en el último año, siendo positivo el resultado de la misma.

Se considera reacción inmediata; aquella que ocurre dentro de la primera hora tras la administración del antibiótico y que se superpone con síntomas sugestivos de reacción alérgica mediada por IgE.

4.4 Ensayo

Fármaco experimental: Amoxiciloil Octa L-Lisina (APL)

Fármaco control negativo: Manitol reconstituido en tampón fosfato, se corresponde con la formulación exacta de excipientes que acompañan al fármaco experimental.

Vía administración: cutánea “skin prick test” e intradérmica.

Criterios de inclusión de pacientes:

- Se incluyeron pacientes de ambos sexos: con edades comprendidas entre los 18 y los 60 años.
- Los pacientes otorgaron de manera previa a la realización del ensayo, su consentimiento informado para participar en el estudio.
- Cumplimiento de las características detalladas en la población, ver punto 3.3.
- Las mujeres en edad fértil presentaron una prueba de embarazo en orina con resultado negativo en los 7 días previos al comienzo del ensayo.

Criterios de exclusión: Fue motivo de exclusión del estudio la presencia de al menos uno de los siguientes criterios:

- Enfermedades inmunopatológicas y/o inmunodeficiencias graves.
- Enfermedades sistémicas graves.
- Trastornos psicológicos/psiquiátricos graves.
- Tratamiento con beta-bloqueantes incluso de forma tópica, o IECAS (48) horas previas al momento de la prueba.
- Presencia de alteración dérmica patológica en el área prevista para la realización de las pruebas cutáneas.
- Enfermedades cardiovasculares importantes conocidas que aumenten el riesgo de efectos adversos tras el uso de adrenalina.
- Mujer gestante que se encuentre en período de lactancia.
- Pacientes con Dermografismo positivo. Son aquellos pacientes con lesiones habonosas, provocadas por la aplicación de una presión sobre la piel produciendo vasoconstricción seguido de picor, eritema e inflamación lineal. Considerándose pacientes con dermatografismo positivo, aquellos que presentan un control negativo superior a 2/3 del control positivo, estos pacientes serán considerados como no válidos.

- Enfermedades que contraindiquen el uso de adrenalina.
- Participación simultánea en otros ensayos clínicos.
- Abuso crónico de alcohol o algún otro tipo de sustancia.
- Sospecha de grandes síndromes cutáneos como Síndrome de hipersensibilidad (DRESS/DHIS), Síndrome de Steven-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica.
- Presencia de dermatitis u otras enfermedades dermatológicas que no permitan la realización de pruebas cutáneas en los antebrazos.

El manejo de los datos del ensayo clínico se practicó con criterios de confidencialidad y calidad. Se creó una base de datos informatizada, esa base estuvo dotada con rangos y filtros para detectar y evitar inconsistencias y errores, y se llevó a cabo una verificación y corrección de datos, así como la eliminación de aquellos datos erróneos o que procediesen de pacientes que no cumplieran con los criterios de inclusión.

4.5 Variables del ensayo

Las variables analizadas en este ensayo se describen a continuación:

Variables descriptivas: Edad y sexo.

Variables de estado de paciente: Antecedentes familiares, antecedentes personales, estado general, diagnóstico, tratamientos médicos previos y concomitantes, signos vitales.

Variables clínicas: La variable clínica considerada ha sido la reacción alérgica previa a aminopenicilina descrita como sigue a continuación, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Fecha de la reacción.
- Datos del medicamento implicado en la reacción.
- Intervalo entre la primera y última dosis y la reacción (clasificación en inmediata y no inmediata, si el intervalo supera o no 1 hora).
- Síntomas: urticaria y/o angioedema.
- Anafilaxia (Cardona et al., 2011): concurrencia de al menos dos órganos afectados: Piel (prurito en palmas o plantas o generalizado, eritema generalizado, urticaria). Aparato respiratorio (disnea, dificultad en el habla o al savia, crisis de asma). Aparato digestivo (náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal intenso). Aparato circulatorio (hipotensión junto con taquicardia y/o pérdida de conciencia).

Variables principales (variables de evaluación de la prueba):

- Medición del diámetro mayor de pápula producido por el compuesto en estudio (APL).
- Valoración de la seguridad mediante documentación de seguimiento de los acontecimientos adversos locales y/o sistémicos que pudieran generarse en el transcurso del ensayo.

Variables diagnósticas:

- Presencia de IgE específica a Amoxicilina.
- Pruebas cutáneas con Amoxicilina positivas, (al menos con una pápula de diámetro mayor ≥ 3 mm con respecto al control negativo) a concentraciones estándar de acuerdo con “European Academy of Allergy and Clinical Immunology” (EAACI).
- Prueba de exposición controlada positiva con Amoxicilina en el último año.

4.6 Procedimiento del estudio

Las pruebas cutáneas (“skin prick test” e intradérmicas) se practicaron con un conjunto de diluciones seriadas de la molécula de APL:

- 0,01 mg/mL
- 0,05 mg/mL
- 0,1 mg/mL
- 0,5 mg/mL

Los viales contenían 0,1 mg de la molécula de APL liofilizado, se reconstituyeron con dos volúmenes diferentes de diluyente:

- 1) La concentración de 0,1 mg/mL: el vial se reconstituyó con 1 mL. A partir del mismo se extrae 0,1 mL y se añade en 0,9 mL de solución tampón fosfato, obteniéndose de este modo la concentración de 0,01 mg/mL.
- 2) La concentración de 0,5 mg/mL: el vial se reconstituyó con 0,2 mL. A partir del mismo se extrae 0,1 mL y se añade en 0,9 mL de solución tampón fosfato, obteniéndose de este modo la concentración de 0,05 mg/mL.

El ensayo se realizó siguiendo las indicaciones recogidas en el algoritmo: “Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics del Grupo ENDA (European Network of Drug Allergy) de la EAACI (European Academy of Allergy and Clinical Immunology)” (Romano et al., 2004).

El ensayo de las distintas concentraciones de la molécula de APL se inició mediante la prueba cutánea “skin prick test”. En aquellos casos cuyo resultado fue negativo, se continuó el ensayo con la realización de la prueba intradérmica. La prueba intradérmica comenzó con la concentración más baja aumentando paulatinamente el estudio a concentraciones superiores, hasta obtener una reacción que fuese positiva.

Pruebas cutáneas mediante la técnica del “skin prick test”: Se realizaron según se describe, depositando una gota de la molécula de APL sobre la piel de la cara palmar del antebrazo del paciente y perforando la epidermis, mediante una lanceta especial de punta de 1 mm y en ángulo recto, para permitir la penetración de la solución a través de la piel e inmediatamente después de la punción, se retiró el exceso de líquido.

Pruebas cutáneas mediante la técnica intradérmica (ID): Se administraron 0,03 mL de cada dosis de la molécula de APL ensayada a nivel de dermis, mediante una jeringa de tuberculina en la cara palmar del antebrazo del paciente formando un ángulo de 10-15 grados con el mismo.

4.7 Desarrollo del ensayo

El ensayo ha estado compuesto por 4 visitas, no obstante las visitas se pudieron reducir a 3, pues dos de ellas se pudieron realizar por contacto telefónico. La visita de selección (V0), la visita experimental (V1) y las visitas finales (V2 y V3), se realizaron según se describe:

Visita de selección (V0): En esta visita se procede a informar al paciente y se obtiene el consentimiento informado firmado por el mismo, tras lo que se cumplimenta la historia clínica, recogiendo las variables descriptivas (edad y sexo) y de diagnóstico (clínico y analítico). En esta visita se realiza también un test de embarazo a aquellas mujeres en edad fértil. La selección de candidatos para el estudio se realiza teniendo en cuenta los siguientes puntos:

- Adecuación de los pacientes a los criterios de inclusión: reclutamiento.
- Diagnóstico convencional/diferencial de la sensibilización.
- Determinación de IgE específica frente a antibióticos β -lactámicos.
- Pruebas cutáneas con Amoxicilina.
- Pruebas de provocación con Amoxicilina.

Visita experimental (V1): Una vez seleccionado el paciente, éste fue citado para la realización de las pruebas cutáneas con la molécula de APL. La evaluación de la dosis del medicamento en estudio (APL) consistió en:

- Control negativo con el excipiente y diluyente de reconstitución mediante prueba en “skin prick test”, en aquellos casos donde la prueba de la molécula de APL en “skin prick test” fue negativa se realizó otro control negativo vía intradérmica (ID).
- Pruebas cutáneas de las concentraciones de la molécula de APL en cinco etapas: el incremento en las etapas (1 a 5) sólo se produjo en caso de negatividad de la anterior.
 1. 0,01 y 0,05 mg/mL mediante prueba en “skin prick test”.
 2. 0,1 y 0,5 mg/mL mediante prueba en “skin prick test”.
 3. Pruebas intradérmicas a 0,01 mg/mL y 0,05 mg/mL.
 4. Prueba intradérmica a 0,1 mg/mL.
 5. Prueba intradérmica a 0,5 mg/mL.
- Obtención de resultados mediante definición planimétrica del diámetro mayor de pápula.

Los pacientes permanecieron en la consulta un mínimo de 30 minutos tras la última lectura de las pruebas diagnósticas. Todos los acontecimientos adversos aparecidos, así como las medidas adoptadas se recogieron en el correspondiente cuaderno de recogida de datos.

Visitas finales (V2 y V3): Transcurridas 48 horas y una semana desde la realización de las pruebas

diagnósticas, se contactó telefónicamente con los pacientes para establecer si experimentaron algún acontecimiento adverso o si requirieron toma de medicación concomitante.

El paciente recibió instrucciones concretas de acudir inmediatamente a la consulta, en caso de aparición de reacciones locales o generales atribuibles a las pruebas cutáneas realizadas. Y existía un número de contacto para que pudieran llamar en cualquier momento si observaban alguna incidencia o efecto adverso como consecuencia del ensayo.

En la Figura 36, se muestra el esquema del diseño y desarrollo del estudio clínico.

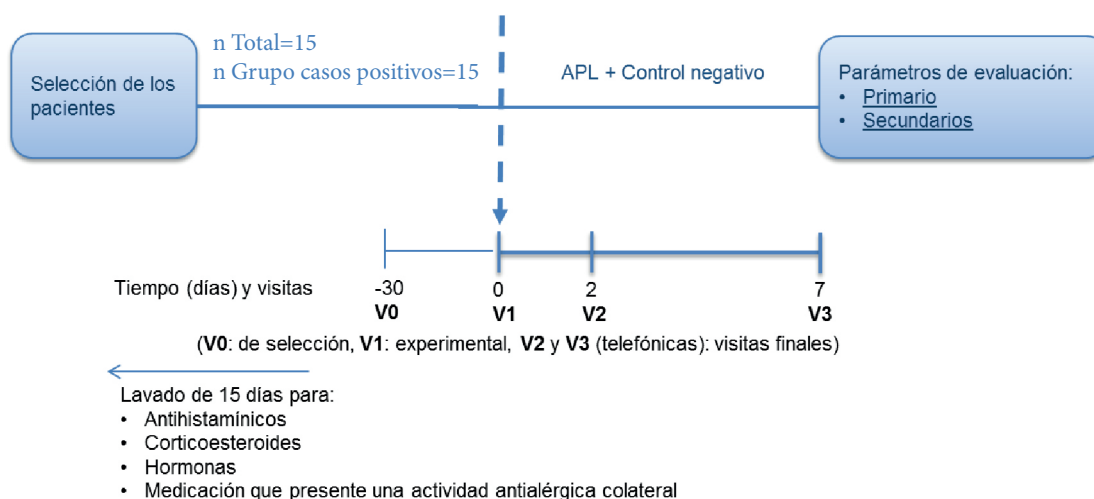


Figura 36. Esquema del diseño y desarrollo del estudio clínico

V0=Visita de selección.

V1=Visita de experimentación

V2 y V3=Visitas finales

4.8 Lectura e interpretación de los resultados de las pruebas cutáneas

Los resultados de las pruebas cutáneas se leyeron entre los 15 - 20 minutos tras su realización. Mediante un rotulador de punta fina se marcó el contorno de la pápula, a tiempo 0 en el caso de la vía intradérmica, y transcurridos 20 minutos tras la aplicación de los reactivos. Por medio de cinta adhesiva transparente los calcos de las pruebas fueron transferidos al cuaderno de resultado de datos.

La manera de valorar las distintas pruebas se muestra a continuación:

- Las pruebas de “skin prick test”: se consideraron positivas en lectura a los 15 o 20 minutos, aquellas que presentaron un diámetro mayor de pápula o igual a los 3 mm (Romano et al., 2004). El control negativo empleado fue tampón fosfato (PBS).
- Las pruebas intradérmicas (ID): se consideraron positivas aquellas cuya diferencia entre el diámetro mayor de la pápula leído a los 20 minutos, menos el diámetro mayor de la pápula leído a tiempo 0, superaba los 3 mm (Romano et al., 2004). Se incorporó PBS como control negativo en vía intradérmica, anotando el tamaño de la pápula inducida por la inyección. No se incluyó en el protocolo, la administración intradérmica con histamina (control positivo), con objeto de evitar las molestias que habitualmente ocasiona esta práctica médica.

4.9 Evaluación de las respuestas: eficacia y seguridad

Evaluación de la eficacia

Se consideraron pacientes evaluables para eficacia todos aquellos en los que presentaron una prueba de exploración diagnóstica completa, siendo la variable principal la diferencia del diámetro mayor de pápula, valorable en términos de sensibilidad.

La dosis óptima de Amoxiciloil-octa-L-lisina (APL), para su uso diagnóstico como determinante mayor en el diagnóstico de alergia a Amoxicilinas y antibióticos afines, se define como aquella que siendo segura y bien tolerada, presenta los mejores parámetros de relación entre sensibilidad y seguridad.

La **sensibilidad** (S) indica la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo, es decir, expresa el grado de sensibilidad de la prueba a la presencia de la enfermedad (Fescina et al., 1985). Para cuantificar su expresión se utilizan términos probabilísticos: si la enfermedad está presente, ¿cuál es la probabilidad de que el resultado sea positivo?

La respuesta es una expresión en términos de probabilidad condicional;

$$S = P (T+/Enf)$$

Es decir, la sensibilidad es la probabilidad de que la prueba identifique como enfermo a aquel que efectivamente lo está.

$$\text{Sensibilidad} = \text{Verdaderos positivos/total de enfermos} = VP / VP + FN = a / a + c$$

a = Verdaderos positivos (VP)

c = Falsos negativos (FN)

Evaluación de la seguridad

La seguridad y tolerancia se cuantificó en función de la incidencia y gravedad de los acontecimientos adversos.

4.10 Cálculo del número de pacientes

El objetivo del ensayo clínico propuesto, fue definir una concentración de la molécula de APL que permitiera obtener el nivel de sensibilidad establecido en la hipótesis de trabajo.

La sensibilidad, introducida por Yerushalmy en 1947 (Yerushalmy, 1947), es un indicador estadístico tradicional y básico que evalúa el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica. Este índice mide la discriminación diagnóstica de una prueba con relación a un criterio de referencia de una prueba diagnóstica que se considera infalible, conocida como “Gold standard test”.

La sensibilidad indica la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo. Esta característica puede estimarse como la proporción de verdaderos positivos y la proporción de falsos. Por tanto, el cálculo del tamaño de muestra para construir un determinado intervalo de confianza del 95%, con una precisión del 90%, para la sensibilidad marcada en la hipótesis de trabajo se basa en el método para la estimación de una proporción.

Los pacientes que conformaron la muestra de éste ensayo fueron clasificados como sujetos enfermos, caracterizados como tales por provocación con el antibiótico sospechoso, prueba de referencia en este tipo de diagnóstico. Cuando se quiere calcular el tamaño de muestra para una determinada sensibilidad, y se conoce la condición de enfermo, no es necesario disponer de la prevalencia de la enfermedad ya que carece de importancia al seleccionar de antemano un número determinado de pacientes enfermos. Así se obtuvo el número de 15 pacientes enfermos, diagnosticados previamente como sensibles a la Amoxicilina.

4.11 Parámetros estadísticos empleados

Para los estadísticos descriptivos de la población de estudio se utilizaron la media, la desviación estándar y el cálculo de proporciones. Para cada una de las concentraciones de la molécula de APL utilizadas en el estudio se calculó la sensibilidad, mediante la siguiente fórmula:

Para cada valor de la sensibilidad, se calculó el intervalo de confianza para un 95 % de nivel de confianza.

$$Sensibilidad = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}}$$

5. Análisis estadístico

Para el cálculo de los estadísticos descriptivos se utilizó el programa Excel 2010. Las comparaciones entre poblaciones y los estudios de regresión y correlación se efectuaron con el programa IBM SPSS Statistics, en su versión 23. Para realizar el cálculo de la sensibilidad y las curvas ROC se utilizó el programa estadístico Epidat en su versión 3.1.

RESULTADOS

1. Amoxiciloil octa-L-Lisina

1.1 Síntesis de Amoxiciloil octa L-lisina (APL)

La molécula obtenida presenta un peso molecular 3966,63, y una fórmula química igual a $C_{176}H_{250}N_{40}O_{49}S_8$. Su estructura se muestra en la Figura 37.

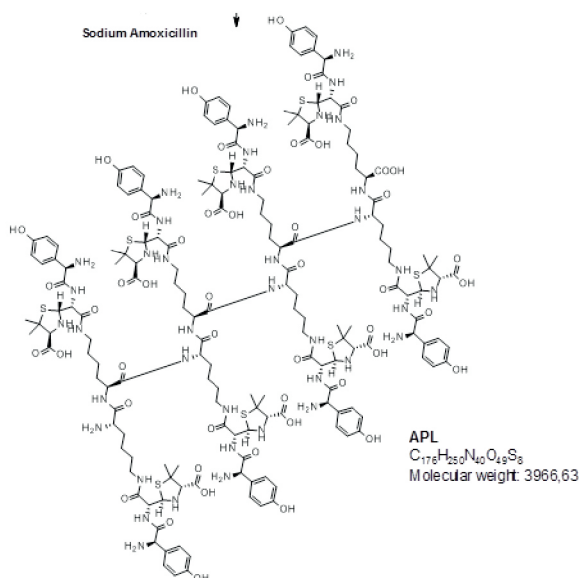


Figura 37. Estructura química y peso molecular de la molécula de APL.

Es un derivado hapténico de la Amoxicilina. Con un aspecto de polvo blanquecino amorfo. Es soluble en soluciones acuosas (pH=7,4), y es soluble en agua (1mg/mL), a 25°C. Además, es soluble en solución salina isotónica (fisiológica) y poco soluble en metanol.

La absorbancia a 232 nm es igual a $1,1 \pm 0,3$. Su pH en una disolución acuosa de 1 mg/mL es igual a $2,65 \pm 0,35$. Su rotación óptica específica ($H_2O + 2\% DMSO$) es de $+35 \pm 10$.

Se realizaron tres experimentos diferentes siguiendo la ruta de síntesis descrita en materiales y métodos (punto 1.3), obteniendo tres resultados para cada uno de los tres experimentos. Se le asignó a cada experimento la siguiente codificación: 110516, 110530, 110627. Las cantidades medias de sustancia obtenidas en los tres experimentos fueron; 450,7 mg. La media de los rendimientos obtenidos fue de un 6%.

Los tres experimentos se analizaron y caracterizaron según los métodos descritos en el apartado de material y métodos, siendo más tarde sometidos a los estudios de estabilidad, en base a lo descrito en las directrices “Note for guidelance on Stability Testing: Stability of New Drug substance and Products. ICH Topic Q1A (R2) (CPMP/ICH/2736/99)”.

1.2 Caracterización de Amoxiciloil octa L-lisina (APL)

La estructura de la Amoxiciloil octa L-lisina (APL), según se recoge en materiales y métodos, fue caracterizada mediante valoración de sustancias relacionadas y valoración de pureza, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (IR), contenido en agua, disolventes residuales, perfil de estabilidad. Para la valoración de sustancias relacionadas y la valoración de pureza, se realizó la validación de ambos métodos analíticos. Los resultados obtenidos para cada técnica se describen a continuación y se muestran en las correspondientes figuras.

1.2.1 Valoración de pureza de Amoxiciloil Octa L-Lisina por HPLC: Validación del método analítico

Linealidad y rango

Se analizaron según el método analítico para la valoración de pureza. Los intervalos de concentraciones utilizadas para los ensayos de linealidad son los siguientes:

Amoxiciloil octa L-lisina: 0,30 mg/ml - 0,48 mg/ml

Estos límites corresponden a variaciones entre el 75% y el 120% de las concentraciones utilizadas en la solución patrón (100%) cuya concentración es 0,4 mg/mL. Como señal respuesta en este método se ha utilizado el área bajo la curva integrada de forma automática. Cada uno de los puntos se determinó por triplicado, siendo la respuesta analítica el valor medio del área bajo la curva de tres replicas iguales.

La técnica resulta ser lineal y proporcional para la molécula de APL dentro del intervalo ensayado. La Tabla 25 muestra los valores obtenidos.

LINEALIDAD Y RANGO	
X (Concentración)	Y (Respuesta Analítica)
75	1757346
90	2096463
100	2341625
110	2624108
120	2875673
Pendiente de la recta de regresión	25042
Ordenada en el Origen	-140135
Coefficiente de correlación (r^2)	0,9982

Tabla 25. Linealidad y rango para valoración de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL).

La Figura 38 muestra la representación gráfica de área frente a concentración, y la ecuación de la recta correspondiente.

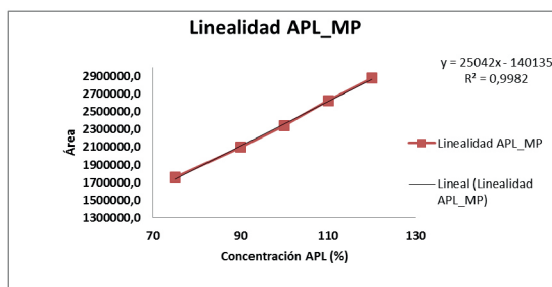


Figura 38. Representación gráfica de la linealidad de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL).

Exactitud

Para evaluar la exactitud del método se ha trabajado con porcentajes de recuperación. Los valores de concentraciones para la molécula de APL, utilizadas para los ensayos de exactitud son los siguientes:

- 75% —————> 0,30 mg/mL
- 100% —————> 0,40 mg/mL
- 120% —————> 0,48 mg/mL

El experimento se efectuó por triplicado para cada nivel de recuperación. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

EXACTITUD PARA VALORACIÓN		
NIVEL DE EXACTITUD	PROBLEMA	% RECUPERACION
75%	P1	100,0
	P2	100,2
	P3	99,7
100%	P1	100,1
	P2	99,4
	P3	100,5
120%	P1	99,9
	P2	100,7
	P3	99,4

Tabla 26. Resultados de exactitud para la valoración de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL).

Selectividad

Se ha comprobado la capacidad de identificar de forma inequívoca el analito de interés APL, en los cromatogramas patrones. No existen interferencias de otros componentes con un comportamiento similar.

Ausencia de interferencias

Se observa en el cromatograma de la solución estándar la ausencia de interferencias en las condiciones habituales del ensayo. El cromatograma de la solución estándar muestra el tiempo de retención y el área para el pico de la molécula de APL (Figura 39).

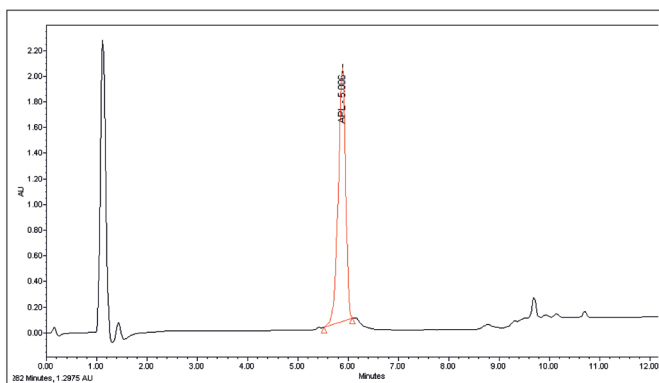


Figura 39. Solución Estándar. 1.- Frente de solvente. 2.- Analito de interés APL.

Precisión

La precisión se determina realizando medidas repetidas de la misma concentración de analito, la concentración es la descrita en el método de valoración de pureza siendo igual a 0,4 mg/mL. Se realizaron tres tipos de ensayos atribuibles a la precisión del método, en los tres ensayos la variabilidad aportada en cada uno de ellos no fue significativa, obteniéndose un valor del coeficiente de variación inferior al 1%.

Precisión del sistema

Se realizan 10 inyecciones sucesivas de una misma muestra. Se utiliza como señal respuesta el área del pico de Amoxiciloil octa-L-Lisina (APL) integrada de forma automática. Los resultados se muestran en la Tabla 27.

PRECISIÓN DEL SISTEMA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	2364053
2	2381992
3	2384237
4	2386018
5	2367528
6	2365557
7	2361119
8	2361180
9	2365613
10	2371693
Media	2370899
Desviación estándar	9632,06
Coefficiente de Variación (%)	0,41
Intervalo de confianza de la media ($\alpha=0,05$)	2370899 \pm 5970

Tabla 27. Precisión del sistema para la valoración de principio activo de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL).

Precisión del método

Se determina realizando medidas repetidas ($n=6$) de la misma concentración de analito. Cada una de las medidas se preparon de manera independiente, y se utiliza como señal respuesta el área del pico integrada de manera automática. Los resultados obtenidos se adjuntan en la Tabla 28.

PRECISIÓN DEL MÉTODO	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	2324270
2	2348800
3	2343268
4	2322504
5	2335277
6	2334017
Media	2334689
Desviación estándar	10300,94
Coefficiente de Variación (%)	0,44
Intervalo de confianza de la media ($\alpha=0,05$)	2334689 \pm 8242

Tabla 28. Precisión del método para la valoración de principio activo de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL).

Precisión Intermedia

Se determina realizando medidas repetidas ($n=6$) de la misma concentración de analito en días consecutivos. Cada una de las medidas se preparon de manera independiente, y se utiliza como señal respuesta el área del pico integrada de manera automática. La variabilidad aportada por el

día del ensayo no fue significativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 29.

PRECISIÓN INTERMEDIA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
Día 1	
1	2324270
2	2348800
3	2343268
4	2322504
5	2335277
6	2334017
Día 2	
1	2336081
2	2325994
3	2351787
4	2336673
5	2310795
6	2332514
Media (12 medidas)	2333498
Desviación estándar	11532,59
Coefficiente de Variación (%)	0,49
Intervalo de confianza de la media ($\alpha=0.05$)	2333498 \pm 6521

Tabla 29. Precisión intermedia para la valoración de principio activo de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL).

Idoneidad del sistema

Se realizó un test de aceptabilidad cromatográfica calculando los parámetros de funcionamiento de columna. Se evalúan la eficacia de la columna (n) y el factor de simetría del pico de la molécula de APL, se realizaron tres inyecciones de una solución estándar y se calcula sobre la media los parámetros indicados. Se hace acorde a las condiciones cromatográficas descritas en el punto 1.3.2.1 de material y métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

IDONEIDAD DEL SISTEMA	
Columna C18-PFP, 75 x 4,6 mm	Amoxiciloil octa-L-Lisina (APL)
Número de platos teóricos, n	1,595677e+004
Factor de simetría	1,200650

Tabla 30. Idoneidad del sistema para la valoración de principio activo de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL).

Los resultados arriba indicados garantizan la idoneidad del método de valoración.

1.2.2 Valoración de sustancias relacionadas de Amoxiciloil Octa L-Lisina por HPLC: Validación del método analítico

Linealidad y rango para impurezas conocidas

Se analizaron según el método de la valoración de sustancias relacionadas, soluciones estándares de las tres impurezas conocidas: Ácido amoxiciloico $t_r=3,6$ min; Amoxicilina sódica $t_r=3,8$ min y Dicotopiperacina $t_r=4,4$ min. Los intervalos de concentraciones utilizadas para los ensayos de linealidad son los siguientes para cada una de las impurezas conocidas:

Ácido amoxiciloico: 0,0008 mg/mL – 0,006 mg/mL
 Amoxicilina sódica: 0,0008 mg/mL – 0,006 mg/mL
 Dicotopiperacina: 0,0008 mg/mL – 0,006 mg/mL

Resultados

Estos límites corresponden a variaciones entre el 20% y el 150% de las concentraciones utilizadas en la solución patrón (100%), cuya concentración es 0,004 mg/mL. Cantidad equivalente al 1% respecto a la concentración de solución estándar de valoración, 0,4 mg/mL.

Como señal respuesta en este método se ha utilizado el área bajo el pico integrada de forma automática. Cada uno de los puntos se determinó por triplicado, siendo la respuesta analítica el valor medio del área bajo la curva de tres replicas iguales.

La técnica resulta ser lineal y proporcional para cada una de las tres impurezas conocidas dentro del intervalo ensayo.

La Tabla 31 muestra los datos obtenidos para la impureza Ácido amoxiciloico.

LINEALIDAD Y RANGO	
X (Concentración)	Y (Respuesta Analítica)
20	30487
25	36328
50	73720
75	109381
100	142608
150	217318
Pendiente de la recta de regresión	1438,7
Ordenada en el Origen	775,79
Coefficiente de correlacion (r^2)	0,9997

Tabla 31. Linealidad y rango para la impureza conocida de Ácido amoxiciloico.

La Figura 40 muestra la representación gráfica de área frente a concentración, y la ecuación de la recta correspondiente, para el Ácido amoxiciloico.

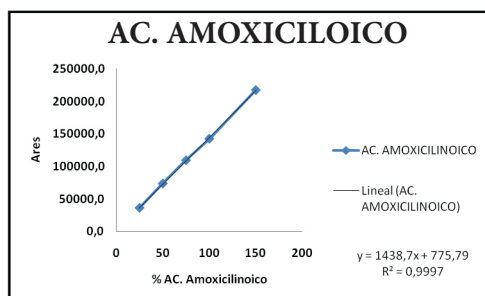


Figura 40. Representación gráfica de la linealidad del ácido amoxiciloico.

La Tabla 32 muestra los datos obtenidos, para la impureza Amoxicilina sódica.

LINEALIDAD Y RANGO	
X (Concentración)	Y (Respuesta Analítica)
20	40109
25	54299
50	106500
75	155983
100	203332
150	309593
Pendiente de la recta de regresión	2029,9
Ordenada en el Origen	3547,3
Coefficiente de correlación (r^2)	0,9996

Tabla 32. Linealidad y rango para la impureza conocida amoxicilina sódica.

La Figura 41 muestra la representación gráfica de área frente a concentración, y la ecuación de la recta correspondiente, para la Amoxicilina sódica.

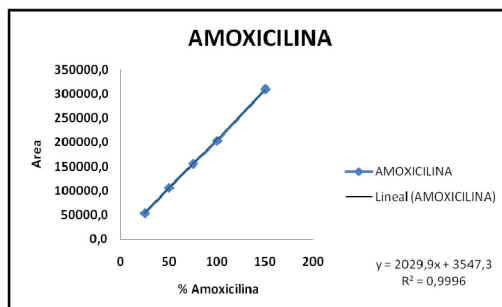


Figura 41. Representación gráfica de la linealidad de Amoxicilina Sódica.

La Tabla 33 muestra los datos obtenidos, para la impureza Dicetopiperacina.

LINEALIDAD Y RANGO	
X (Concentración)	Y (Respuesta Analítica)
20	93515
25	142665
50	242000
75	348910
100	454024
150	682074
Pendiente de la recta de regresión	4321,6
Ordenada en el Origen	28209
Coefficiente de correlación (r^2)	0,9992

Tabla 33. Linealidad y rango para la impureza conocida dicetopiperacina

La Figura 42 muestra la representación gráfica de área frente a concentración, y la ecuación de la recta correspondiente, para la Dicetopiperacina.

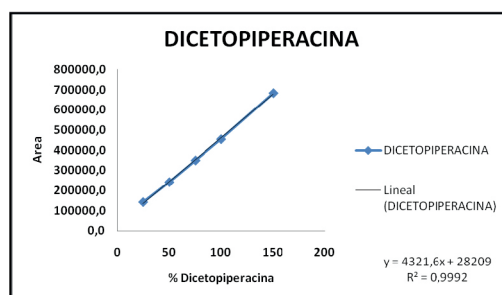


Figura 42. Representación gráfica de la linealidad de dicetopiperacina.

Selectividad para impurezas conocidas y desconocidas

Se ha comprobado la capacidad de identificar de forma inequívoca los diferentes analitos de interés: Ácido amoxiciloico, Amoxicilina sódica y Dicetopiperacina, en los cromatogramas patrones.

Ausencia de interferencias

Se observa en el cromatograma de la solución estándar para la valoración de sustancias relacionadas, la ausencia de interferencias en las condiciones habituales del ensayo.

El cromatograma de la solución estándar muestra el tiempo de retención y el área para los picos asignados a cada una de las tres impurezas conocidas (Figura 43). También se muestra el tiempo de retención y el área para las impurezas desconocidas (Figura 44).

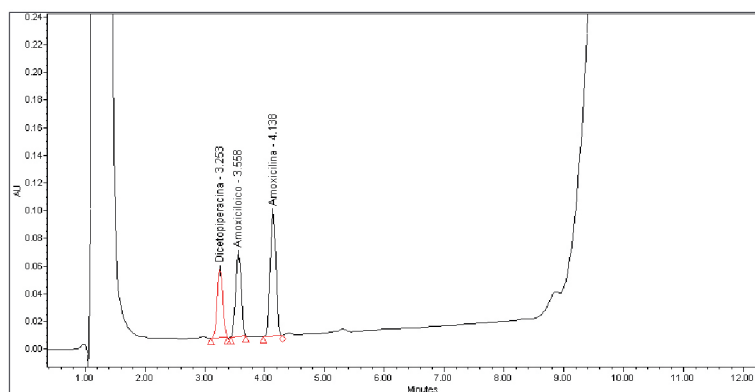


Figura 43. Cromatograma de la solución estándar para el cálculo de Impurezas conocidas.
1.- Dicetopiperacina. 2.- Ácido amoxiciloico. 3.- Amoxicilina sódica.

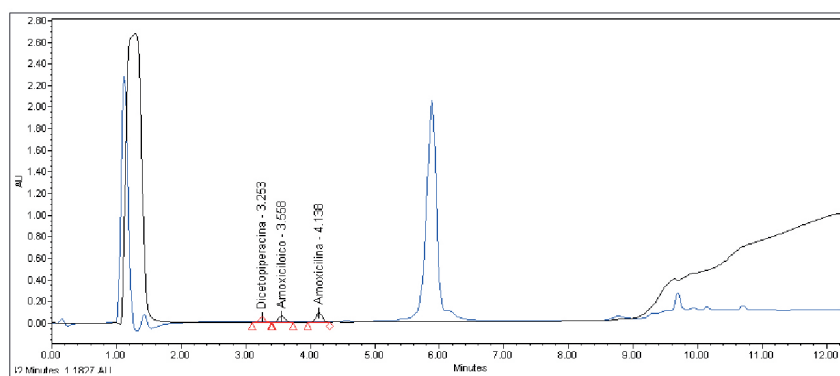


Figura 44. Cromatograma de la solución estándar para el cálculo de Impurezas desconocidas.
1.- Frente de solvente. 2.- Dicetopiperacina. 3.- Ácido amoxiciloico. 4.- Amoxicilina sódica. 5.- APL.

Exactitud para impurezas conocidas

La exactitud del método se determinó mediante porcentajes de recuperación. Se prepararon muestras de Amoxiciloil-octa-L-lisina a la concentración de 0,4 mg/mL, y se añadió las siguientes concentraciones de cada una de las tres impurezas conocidas:

- 50% —→ 0,002 mg/mL
- 100% —→ 0,004 mg/mL
- 150% —→ 0,006 mg/mL

El experimento se efectuó por triplicado para cada nivel de recuperación. Los resultados de recuperación para Ácido amoxiciloico se muestran en la Tabla 34.

EXACTITUD		
NIVEL DE EXACTITUD	PROBLEMA	% RECUPERACION
50%	P1	99,6
	P2	99,2
	P3	101,2
100%	P1	99,9
	P2	100,3
	P3	99,9
150%	P1	102,5
	P2	99,9
	P3	97,6

Tabla 34. Resultados de exactitud para la impureza conocida ácido amoxiciloico.

Los resultados de recuperación la Amoxicilina sódica se muestran en la Tabla 35.

EXACTITUD		
NIVEL DE EXACTITUD	PROBLEMA	% RECUPERACION
50%	P1	102,5
	P2	99,2
	P3	98,4
100%	P1	101,8
	P2	99,0
	P3	99,2
150%	P1	98,6
	P2	102,8
	P3	98,6

Tabla 35. Resultados de exactitud para la impureza conocida amoxicilina sódica.

Los resultados de recuperación para la Dicotopiperacina se muestran en la Tabla 36.

EXACTITUD		
NIVEL DE EXACTITUD	PROBLEMA	% RECUPERACION
50%	P1	99,2
	P2	101,3
	P3	99,4
100%	P1	99,3
	P2	100,9
	P3	99,8
150%	P1	98,6
	P2	100,9
	P3	100,5

Tabla 36. Resultados de exactitud para la impureza conocida dicetopiperacina

Precisión

La precisión se determina realizando medidas repetidas de la misma concentración de analito, siendo el analito cada una de las tres impurezas conocidas. La concentración es la descrita en el método de valoración de sustancias relacionadas 0,004 mg/mL. Se realizaron tres tipos de ensayos atribuibles a la precisión del método, en los tres ensayos la variabilidad aportada en cada uno de ellos no fue significativa, obteniéndose un valor del coeficiente de variación inferior al 3%.

Precisión del sistema para impurezas conocidas

Se realizan 10 inyecciones sucesivas de una misma muestra. Se utiliza como señal respuesta el área de los picos de Ácido amoxiciloico, Amoxicilina sódica y Dicetopiperacina, integrados de forma automática. Los resultados se muestran en las Tablas 37, 38 y 39.

PRECISIÓN DEL SISTEMA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	164454
2	160390
3	162349
4	161508
5	160481
6	161911
7	161480
8	161440
9	162325
10	151883
Media	160822,10
Desviación estándar	3341,0
Coefficiente de Variación	2,08 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	160822,10 ± 2070,75

Tabla 37. Precisión del sistema para la impureza ácido amoxiciloico.

PRECISIÓN DEL SISTEMA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	211660
2	223936
3	213493
4	217418
5	215965
6	214252
7	217438
8	227966
9	215213
10	213088
Media	217042,90
Desviación estándar	5127,7
Coefficiente de Variación	2,36 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	217042,90 ± 3178,15

Tabla 38. Precisión del sistema para la impureza amoxicilina sódica.

PRECISIÓN DEL SISTEMA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	476176
2	483896
3	482328
4	437589
5	471986
6	483904
7	475757
8	476924
9	475697
10	478661
Media	474291,80
Desviación estándar	13479,7
Coefficiente de Variación	2,84 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	474291,80 ± 8354,64

Tabla 39. Precisión del sistema para la impureza dicetopiperacina.

Precisión del método para impurezas conocidas

Se determina realizando medidas repetidas (n=6) de la misma concentración de cada uno de las tres impurezas conocidas. Cada una de las medidas se preparó de manera independiente, y se utiliza como señal respuesta el área del pico integrada de manera automática para los picos

de Ácido amoxiciloico, Amoxicilina sódica y Dicotopiperacina. Los resultados obtenidos se adjuntan en las Tablas 40, 41 y 42.

PRECISIÓN DEL MÉTODO	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	308020
2	305028
3	292925
4	306410
5	306288
6	305760
Media	304072
Desviación estándar	5549,46
Coefficiente de Variación	1,83
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	304072 ± 4440,4

Tabla 40. Precisión del método para la impureza ácido amoxiciloico

PRECISIÓN DEL MÉTODO	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	240771
2	248851
3	254233
4	255890
5	254793
6	244878
Media	249903
Desviación estándar	6136,06
Coefficiente de Variación	2,46 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	249903 ± 4909,8

Tabla 41. Precisión del método para la impureza amoxicilina sódica.

PRECISIÓN DEL MÉTODO	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	475647
2	481145
3	488925
4	482074
5	483653
6	488298
Media	483290
Desviación estándar	4928,70
Coefficiente de Variación	1,02 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	483290 ± 3943,7

Tabla 42. Precisión del método para la impureza dicotopiperacina.

Precisión Intermedia para impurezas conocidas

Se determina realizando medidas repetidas (n=6) de la misma concentración de cada una de las tres impurezas conocidas, en días consecutivos. Cada una de las medidas se preparon de manera independiente, y se utiliza como señal respuesta el área del pico integrada de manera automática. La variabilidad aportada por el día del ensayo no fue significativa en ninguno de las tres impurezas ensayadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tablas 43, 44 y 45.

PRECISIÓN INTERMEDIA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
Día 1	
1	308020
2	305028
3	292925
4	306410
5	306288
6	305760
Día 2	
1	302661
2	305344
3	304602
4	304494
5	304292
6	297706
Media	303628
Desviación estándar	4223,89
Coefficiente de Variación	1,39 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	303628 ± 3379,8

Tabla 43. Precisión intermedia para la impureza ácido amoxiciloico.

PRECISIÓN INTERMEDIA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
Día 1	
1	240771
2	248851
3	254233
4	255890
5	254793
6	244878
Día 2	
1	249841
2	243896
3	240301
4	248778
5	241179
6	255477
Media	248241
Desviación estándar	5968,29
Coefficiente de Variación	2,40 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	248241 ± 4775,5

Tabla 44. Precisión intermedia para la impureza amoxicilina sódica.

PRECISIÓN INTERMEDIA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
Día 1	
1	475647
2	481145
3	488925
4	482074
5	483653
6	488298
Día 2	
1	484887
2	477777
3	479578
4	487480
5	487909
6	487113
Media	483707
Desviación estándar	4468,08
Coefficiente de Variación	0,92 %
Intervalo de confianza de la media (P=0.05)	483707 ± 3575,1

Tabla 45. Precisión intermedia para la impureza dicetopiperacina.

Límite de detección para impurezas conocidas.

El límite de detección para el método de valoración sustancias relacionadas para las impurezas conocidas es igual a 0,0002 mg/mL. Este límite se ha calculado de manera experimental, se ha preparado una solución que contenía las tres impurezas conocidas en cantidad equivalente al

1% respecto a la concentración del análisis de valoración del principio activo. A partir de la misma solución se han ido haciendo diluciones, y se han medido por HPLC con el mismo método analítico, el límite 0,0002 mg/mL se corresponde con la última concentración de la serie de diluciones capaz de dar señal analítica.

Límite de cuantificación para impurezas conocidas.

El límite de cuantificación para el método de valoración de sustancias relacionadas para las impurezas conocidas es igual a 0,0004 mg/mL. Este límite se ha calculado de manera experimental, se ha preparado una solución que contenía las tres impurezas conocidas en cantidad equivalente al 1% respecto a la concentración del análisis de valoración de principio activo. A partir de la misma solución se han ido haciendo diluciones, y se han medido por HPLC con el mismo método analítico, el límite 0,0004 mg/mL se corresponde con la dilución inmediatamente anterior al límite de detección.

Idoneidad del sistema para impurezas conocidas.

Se realizó un test de aceptabilidad cromatográfica calculando los parámetros de funcionamiento de columna. Se evalúan la eficacia de la columna (n) y el factor de simetría del pico de la molécula de APL, y el factor de resolución de cada una de las impurezas respecto del pico principal de la molécula de APL. Se realizaron tres inyecciones de una solución estándar y se calcula sobre la media los parámetros indicados. Se hace acorde a las condiciones cromatográficas descritas en el punto 1.3.2.1 de material y métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 46.

IDONEIDAD	
Columna C18-PFP, 75 x 4,6 mm	Ácido amoxiciloico
Número de platos teóricos, n	2.085e+003
Factor de simetría	0.995
Factor de resolución entre el pico de APL y de Ácido amoxiciloico	2.354
Columna C18-PFP, 75 x 4,6 mm	Amoxicilina Sódica
Número de platos teóricos, n	3.037e+004
Factor de simetría	0.956
Factor de resolución entre el pico de APL y de Amoxicilina Sódica	7.888
Columna C18-PFP, 75 x 4,6 mm	Dicetopiperacina
Número de platos teóricos, n	5.222e+004
Factor de simetría	0.971
Factor de resolución entre el pico de APL y de Dicetopiperacina	3.880

Tabla 46. Idoneidad del sistema para la valoración de las sustancias relacionadas

Los resultados arriba indicados garantizan la idoneidad del método de valoración de sustancias relacionadas.

Linealidad y rango para impurezas desconocidas.

Se analizó según el método de valoración de sustancias relacionadas descrito en el apartado 1.3.1.1 de material y métodos. Los intervalos de concentraciones para las soluciones estándares utilizados para los ensayos de linealidad son los siguientes:

Amoxiciloil octa-L-lisina: 0,001 mg/mL – 0,4 mg/mL

Resultados

Estos límites corresponden a variaciones entre el 0,25% y el 100% de las concentraciones utilizadas en la solución estándar (100%) cuya concentración es 0,004 mg/mL. Como señal respuesta en este método se ha utilizado el área bajo el pico integrada de forma automática. Cada uno de los puntos se determinó por triplicado, siendo la respuesta analítica el valor medio del área bajo la curva de tres replicas iguales. La Tabla 47 muestra los datos obtenidos.

La técnica resulta ser lineal dentro del intervalo ensayo.

LINEALIDAD Y RANGO	
X (Concentración)	Y (Respuesta Analítica)
100	14147474
50	6962531
10	1387103
5	679115
4	589833
3	423338
1	145868
0,5	69922
0,25	31560
Pendiente de la recta de regresión	9631,5
Ordenada en el Origen	141142
Coefficiente de correlación (r^2)	0,9999

Tabla 47. Linealidad y rango para impurezas desconocidas

La Figura 45 muestra la representación gráfica de área frente a concentración, y la ecuación de la recta correspondiente.

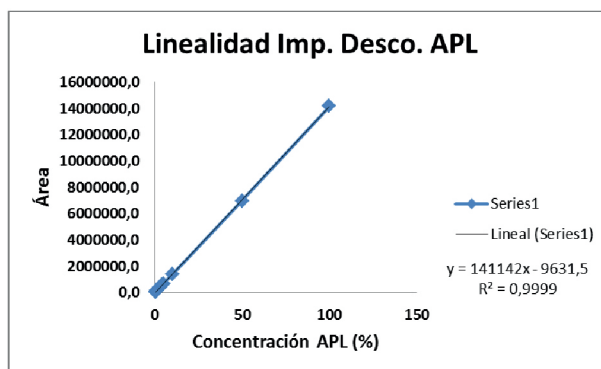


Figura 45. Representación gráfica de la linealidad y rango Impurezas desconocidas.

Límite de detección para impurezas desconocidas

El límite de detección para el método de valoración de impurezas desconocidas es igual a 0,0004 mg/mL. Este límite se ha calculado de manera experimental, se ha preparado una solución que contenía APL en cantidad equivalente al 1% respecto a la concentración nominal usada en la valoración del principio activo. A partir de la misma se han realizado diluciones, las cuales se han ido midiendo en el HPLC. La última concentración de la serie de diluciones realizadas capaz de dar señal analítica, se corresponde con 0,0004 mg/mL y con el límite de detección.

Límite de cuantificación para impurezas desconocidas

El límite de cuantificación para el método de impurezas desconocidas es igual a 0,001 mg/mL. Este límite se ha calculado de manera experimental una vez que se ha determinado el límite de detección, la dilución inmediatamente anterior que emite respuesta cuantificable en el HPLC, se corresponde con el límite de cuantificación. Este valor coincide con el último punto calculado en la linealidad, 0,25% equivalente a una concentración de 0,001 mg/mL.

Condiciones de stress de la muestra. Máxima degradación

Mediante este estudio se determinaron los compuestos potencialmente interferentes. Se comprueba que la identidad del analito y la señal, proviene sólo del analito. Los ensayos se realizaron con la siguiente relación de condiciones:

- Ácido clorhídrico 1M, durante 24 horas.
- Luz natural, durante 24 horas.
- 100°C, durante 24 horas.
- Hidróxido sódico 1M, durante 24 horas.
- Peróxido de Hidrógeno 3%, durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas se realizó la inyección de los diferentes ensayos, en las condiciones descritas en el apartado 1.3.1.1 de material y métodos.

Se adjunta un cromatograma en cada una de los distintos ensayos, Figuras 46, 47 y 48.

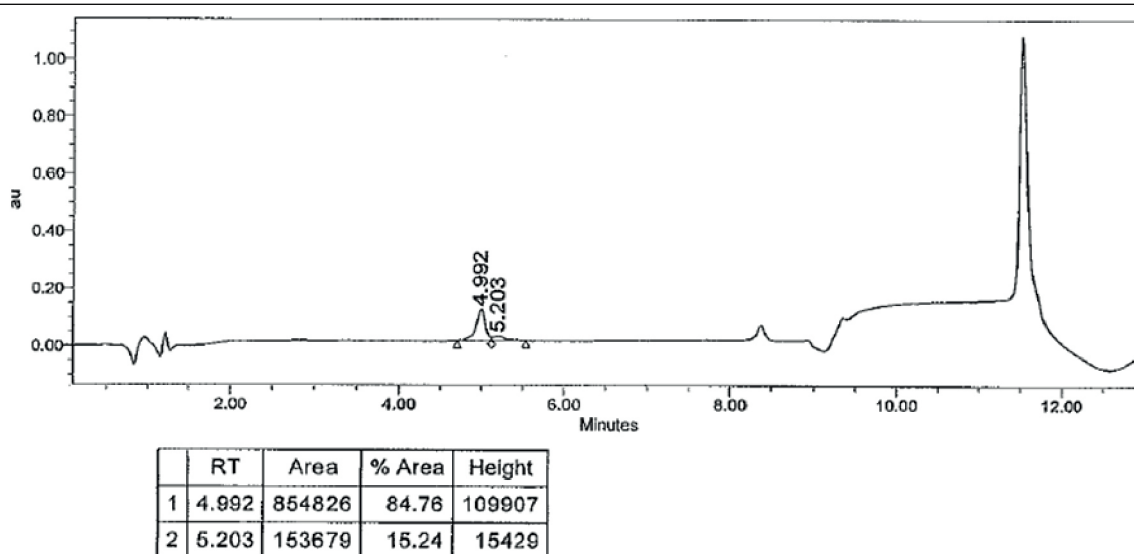


Figura 46. Cromatograma del estándar de APL sometido a HCl 1M, durante 24 horas.

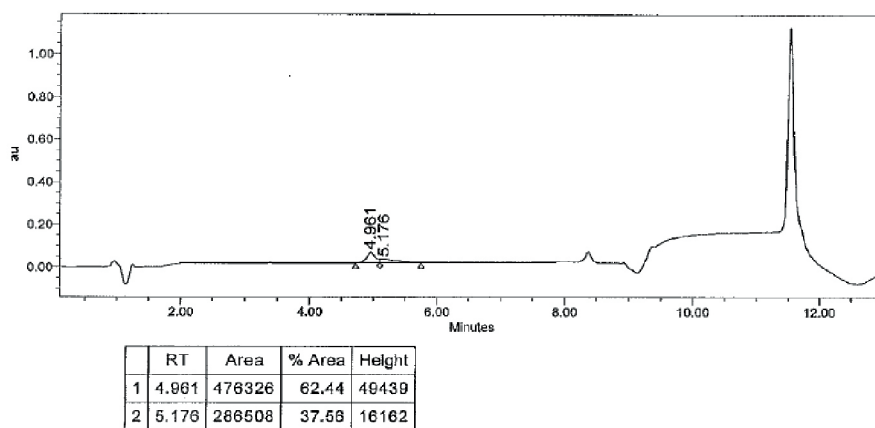


Figura 47. Cromatograma del estándar de APL en presencia de luz natural, durante 24 horas.

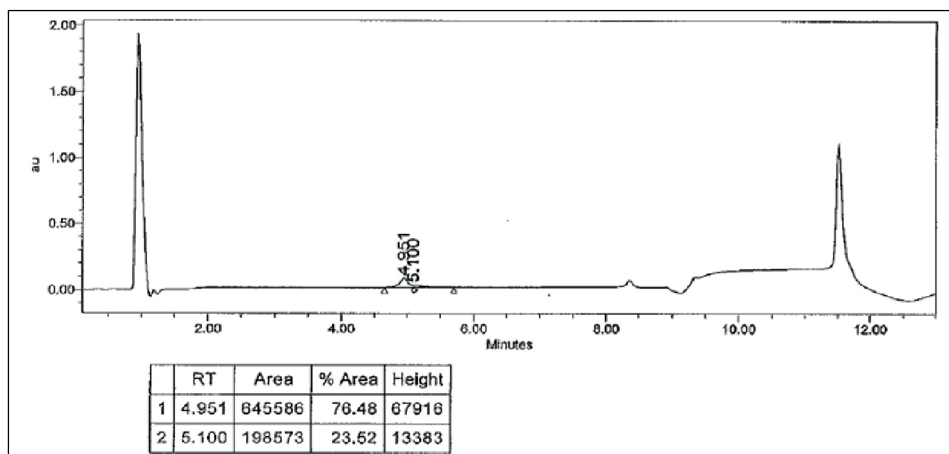


Figura 48. Cromatograma del estándar de APL sometido a 100°C, durante 24 horas

Para el resto de condiciones, (NaOH 1M y H₂O² 3%) las muestras obtenidas no mostraron perfiles cromatográficos en las condiciones ensayadas.

Precisión

La precisión se determina realizando medidas repetidas de la misma concentración de analito. La concentración a la que se realiza esta precisión es de 0,004 mg/mL. Se realizaron tres tipos de ensayos atribuibles a la precisión del método, en los tres ensayos la variabilidad aportada en cada uno de ellos no fue significativa, obteniéndose un valor de coeficiente de variación inferior al 2%.

Precisión del sistema para impurezas desconocidas

Se realizan 10 inyecciones sucesivas de una misma muestra. Se utiliza como señal respuesta el área de Amoxiciloil octa-L-Lisina de forma automática. Los resultados se muestran en la Tabla 48.

PRECISIÓN DEL SISTEMA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	143510
2	144855
3	144861
4	138597
5	140755
6	145888
7	144360
8	144142
9	144985
10	144582
Media	143653,5
Desviación estándar	2242,5
Coefficiente de Variación (%)	1,56
Intervalo de confianza de la media ($\alpha=0,05$)	143653 \pm 1389

Tabla 48. Precisión del sistema para valoración de Impurezas desconocidas de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL)

Precisión del método para impurezas desconocidas

Se determina realizando medidas repetidas (n=6) de la misma concentración. Cada una de las medidas se preparó de manera independiente, y se utiliza como señal respuesta el área del pico Amoxiciloil octa-L-lisina, integrada de manera automática. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 49.

PRECISIÓN DEL MÉTODO	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
1	144803
2	144722
3	145888
4	144708
5	146436
6	144315
Media	145145
Desviación estándar	823,95
Coefficiente de Variación (%)	0,57
Intervalo de confianza de la media ($\alpha=0.05$)	145145 \pm 659

Tabla 49. Precisión del método para valoración de Impurezas desconocidas de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL)

Precisión Intermedia para impurezas desconocidas

Se determina realizando medidas repetidas (n=6) de la misma concentración de la muestra, en dos días consecutivos. Cada una de las medidas se preparó de manera independiente, y se utiliza como señal respuesta el área del pico integrada de manera automática. La variabilidad aportada por el día del ensayo no fue significativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 50.

PRECISIÓN INTERMEDIA	
DETERMINACIÓN	ÁREA DEL PICO
Día 1	
1	144803
2	144722
3	145888
4	144708
5	146436
6	144315
Día 2	
1	140113
2	144438
3	147139
4	144771
5	144108
6	143680
Media (12 medidas)	144593
Desviación estándar	1729,48
Coficiente de Variación (%)	1,20
Intervalo de confianza de la media ($\alpha=0,05$)	144593 \pm 979

Tabla 50. Precisión intermedia para valoración de Impurezas desconocidas de amoxiciloil octa-L-Lisina (APL)

1.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de Amoxiciloil octa L-Lisina

La molécula de APL ha sido considerada como un polímero, compuesto por 8 unidades monoméricas, que contiene una lisina unida a un resto de amoxiciloico, se entiende que la disposición en el espacio de las 8 unidades monoméricas que constituyen la molécula de APL, no son equivalentes y presentan un desplazamiento químico diferente en el espectro de resonancia magnética de protón.

Con este análisis de ^1H -RMN y los desplazamientos químicos esperados, se ha observado:

- Los grupos metilo (CH_3) de la Amoxicilina aparecían mezclados con algunos grupos CH_2 correspondientes a la cadena lateral de la lisina como el desplazamiento químico es muy similar. Se detectaron en la región 1,00-2,00 ppm.
- Existía un segundo grupo de las señales en torno a 3,50 ppm, donde confluyen los protones pertenecientes a los carbonos C-3, C-9 y C-14 de la Amoxicilina.
- Se podía distinguir tres tipos diferentes de protones amida (CONH), pertenecientes a diferentes tipos de enlaces amida en la molécula, por tanto, la asignación de estos protones no pudo ser muy precisa. Aparecían en el rango de 7,90-8,60 ppm.
- Las señales pertenecientes a los diferentes grupos de amina secundarias (NH_2) se correspondían con un desplazamiento químico de 4,5-5,2 ppm.
- También se pudo apreciar la señal correspondiente al protón del ácido carboxílico libre de los restos de amoxiciloico $\delta = 9,8$ ppm.

La Figura 49 muestra el espectro de ^1H -RMN para la molécula de APL

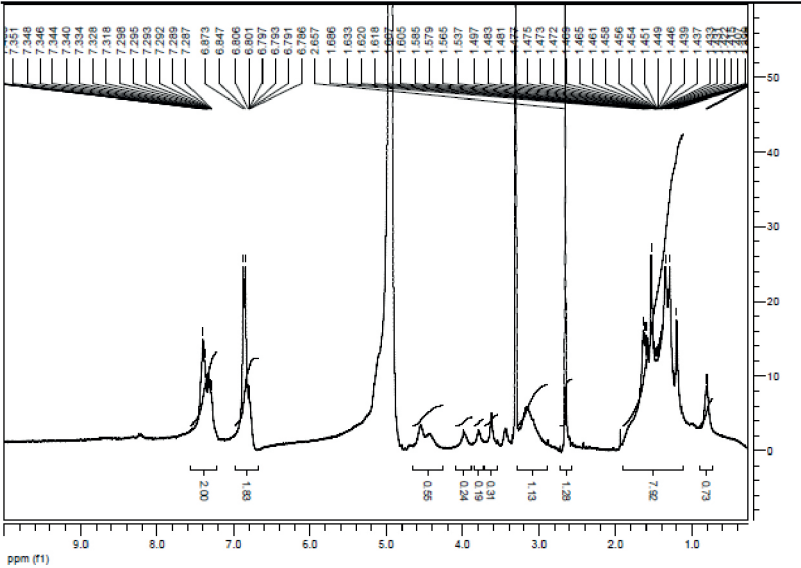


Figura de 49. ^1H -NMR (DMSO- d_6) Amoxiciloil Octa L Lisina (APL)

El monómero de Lys-amoxiciloico al estar cerca del final de la cadena, presenta un comportamiento diferente a las unidades de Lys-amoxiciloico que se encuentran en el centro de la molécula. Esta ha sido la principal dificultad para asignar cada señal.

En relación al espectro de ^{13}C -RMN, se aprecia:

- A desplazamientos químicos bajos, se observaron todos los carbonos alifáticos del esqueleto de lisina y de la parte alifática de la Amoxicilina $\delta = 23\text{-}31$ ppm.
- Se observó un segundo grupo de señales pertenecientes a los carbonos orto y para del anillo aromático $\delta = 115$ y 125 ppm.
- Se apreciaron las señales de los carbonos cuaternarios del fenol y de los ácidos carboxílicos para un desplazamiento químico de $159\text{-}168$ ppm.

La Figura 50 muestra el espectro de ^{13}C -RMN para la molécula de APL.

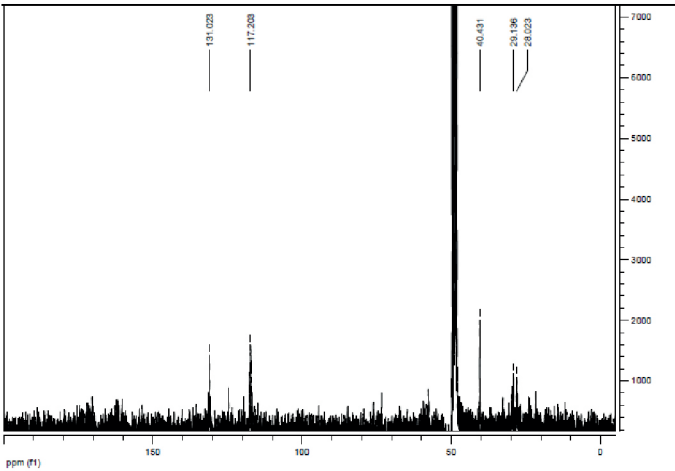


Figura 50. ^{13}C -NMR (DMSO- d_6) Amoxiciloil Octa L Lisina (APL)

1.2.4 Infrarrojos de Amoxiciloil octa L-Lisina

Los resultados obtenidos tras la realización del espectro IR, permitieron determinar las señales características de los grupos funcionales en la molécula de Amoxiciloil octa-Llisina, los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 51 y la Figura 51.

Longitud de onda (cm-1)	Intensidad	Tipo de vibración
3306,00	Media	v(CO) y v(NH)
3062,73	Débil	v(CH) aromático
2929,83	Débil	v(CH ₃) alifáticos
1672,94	Fuerte	N(C=O) amida y v(COO)
1202,12	Fuerte	Metilenos alifáticos.
1140,20	Fuerte	
841,34	Media	
723,38	Media	

Tabla 51. Espectro de IR para la molécula Amoxiciloil Octa L Lisina (APL)

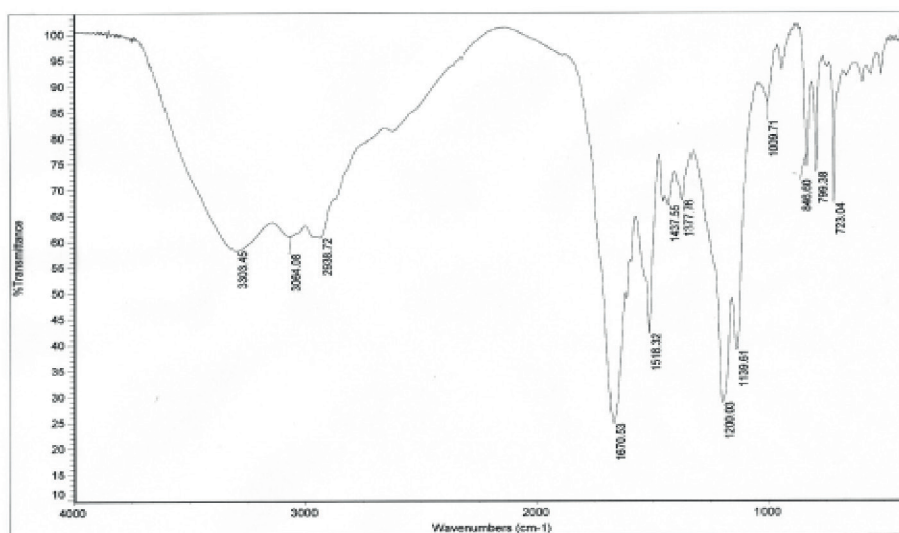


Figura 51. IR de Amoxiciloil Octa L Lisina (APL)

1.2.5 Identificación, pureza, valoración de impurezas, contenido en agua, contenido de disolventes residuales de Amoxiciloil octa L-Lisina (APL)

Los resultados analíticos obtenidos en los tres experimentos realizados demuestran la consistencia y reproducibilidad del proceso. Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 52.

Parámetro	Método	Límites de especificación	Experimento		
			110516	110530	110627
Apariencia	Visual	Polvo amorfo blanco o casi blanco	Conforme	Conforme	Conforme
Identificación: (Tr) minutos	Método (HPLC/UV)	6,0 ±0,5 min	5,7 min	5,7 min	5,7 min
Pureza	Método (HPLC/UV)	≥ 95%	100,48%	99,26%	100,15%
Impurezas totales	Método (HPLC/UV)	≤ 5%	1,79 %	1,55 %	2,02 %
Dicetopiperazina		≤ 1%	ND	ND	ND
Ácido Amoxiciloico		≤ 1%	ND	ND	ND
Amoxicilina sódica		≤ 1%	ND	ND	ND
Impurezas desconocidas		≤ 2%	1,79 %	1,55 %	2,02 %
Humedad	Karl Fischer Columétrico	≤ 7%	1,55%	1,50%	1,45%
Acetonitrilo residual	Cromatografía Gases	< 410 ppm	105,0	34,6	40,0

Tabla 52. Resultados analíticos de los tres experimentos de APL.

1.2.6 Perfil de estabilidad: resultados de estabilidad de la Amoxiciloil octa L-lisina (APL)

Los parámetros evaluados en cada uno de los diferentes puntos de estabilidad han sido los siguientes:

- Apariencia.
- Identificación.
- Riqueza.
- Impurezas.
- Contenido en agua.

El contenido de acetonitrilo, aunque es un parámetro que forma parte en la caracterización de la molécula, no se incluyó en la evaluación de la estabilidad ya que su contenido fue inferior a las recomendaciones de farmacopea europea y no se esperaba un aumento progresivo del mismo a lo largo del tiempo.

Las Tablas 53, 54 y 55 muestran los resultados obtenidos de cada uno de los tres experimentos:

Resultados

Parámetros		Especificaciones	Inicio	40°C/75%RH			30°C/65%RH				25°C/60%RH				5°C			
			0M	3M	6M	3M	6M	9M	12M	3M	6M	9M	12M	3M	6M	9M	12M	
Apariencia		Polvo blanco *	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	
Valoración		> 95%	100,5	102,8	95,88	101,39	99,74	99,69	84,4	99,31	100,7	104,4	98,9	100,1	101,9	96,8	101,1	
Sustancias relacionadas	Dicetopiperazina	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Amoxiciloico	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Amoxicilina	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Impurezas desconocidas	NMT 2%	1,8	8,2	8,6	5,2	2,6	2,6	ND	1,8	2,6	3,0	ND	1,8	1,4	1,5	1,45	
	Total	NMT 5.0%	1,8	8,2	8,6	5,2	2,6	2,6	2,3	3,1	2,6	3,0	1,1	3,8	1,4	1,5	1,35	
Contenido en agua		NMT 7.0%	5,5	5,7	6,0	6,0	3,8	4,7	3,2	5,3	4,8	4,7	5,23	4,7	3,4	3,5	3,2	
Identificación		6,0 ± 0,5 min	5,8	5,9	5,6	5,9	5,6	5,7	5,7	5,9	5,6	5,7	5,7	5,6	5,6	5,8	5,8	
*Polvo amorfo blanco o casi blanco																		

*Polvo amorfo blanco o casi blanco

Tabla 53. Resultados obtenidos de las diferentes condiciones de estabilidad del experimento 110516

Parámetros		Especificaciones	Inicio	40°C/75%RH			30°C/65%RH				25°C/60%RH				5°C			
			0M	3M	6M	3M	6M	9M	12M	3M	6M	9M	12M	3M	6M	9M	12M	
Apariencia		Conforme	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	
Valoración		> 95%	99,3	103,2	95,43	101,94	99,18	96,8	90,4	104,7	99,3	99,33	99,1	102,6	99,44	97,9	100,2	
Sustancias relacionadas	Dicetopiperazina	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Amoxiciloico	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Amoxicilina	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Impurezas desconocidas	NMT 2%	1,6	5,4	5,4	3,3	9,2	4,5	ND	1,9	2,2	2,5	ND	1,9	1,8	1,8	1,5	
	Total	NMT 5.0%	1,6	5,4	5,4	3,3	9,2	4,5	2,3	2,9	2,2	2,5	1,3	2,9	1,8	1,8	1,6	
Contenido en agua		NMT 7.0%	5,8	5,1	6,3	5,1	5,9	5,6	4,6	4,9	3,6	5,1	5,3	4,2	4,2	5,2	4,9	
Identificación		6,0 ± 0,5 min	5,7	5,9	5,6	5,9	5,6	5,6	5,7	5,9	5,6	5,6	5,7	5,9	5,6	5,6	5,8	
*Polvo amorfo blanco o casi blanco																		

*Polvo amorfo blanco o casi blanco

Tabla 54. Resultados obtenidos de las diferentes condiciones de estabilidad del experimento 110530.

Parámetros		Especificaciones	Inicio	40°C/75%RH			30°C/65%RH				25°C/60%RH				5°C			
			0M	3M	6M	3M	6M	9M	12M	3M	6M	9M	12M	3M	6M	9M	12M	
Apariencia		Conforme	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	Conf.	
Valoración		> 95%	99,3	75,3	101,8	93,8	100,7	99,34	92,3	99,3	99,8	100,5	98,6	98,7	103,5	98,3	99,1	
Sustancias relacionadas	Dicetopiperazina	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Amoxiciloico	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Amoxicilina	NMT 1.0%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Impurezas desconocidas	NMT 2%	1,6	6,5	2,5	3,0	2,3	3,7	ND	1,6	2,0	2,2	ND	2,0	2,0	2,0	1,5	
	Total	NMT 5.0%	1,6	6,5	2,5	3,0	2,3	3,7	3,2	1,6	2,0	2,2	1,8	2,0	2,0	2,0	1,6	
Contenido en agua		NMT 7.0%	5,8	5,1	5,5	5,0	5,1	5,0	4,6	5,2	3,8	4,2	5,9	4,4	4,4	5,2	4,6	
Identificación		6,0 ± 0,5 min	5,7	5,9	5,6	5,9	5,6	5,6	5,7	5,9	5,6	5,6	5,7	5,9	5,6	5,6	5,8	
*Polvo amorfo blanco o casi blanco																		

*Polvo amorfo blanco o casi blanco

Tabla 55. Resultados obtenidos de las diferentes condiciones de estabilidad del experimento 110627

2. Perfil de seguridad de Amoxiciloil octa L-lisina (APL)

2.1 Toxicidad aguda: Resultados de la dosis máxima no irritante

El estudio se realizó para determinar la concentración máxima no irritante de la molécula de APL después de una administración intradérmica única a ratas Sprague Dawley. El estudio se diseñó en dos partes según se recoge en material y métodos (punto 2.1).

Se evaluó la reacción de la piel en cada lugar de la inyección, tales como la presencia de eritema y edema. La reacción fue evaluada individualmente a los 30 minutos, 1, 2, 4 y 6 horas después de la administración, y diariamente durante un período de observación de 14 días. El peso corporal se registró semanalmente. Al finalizar el período de observación, los animales fueron sacrificados.

La clasificación de las concentraciones medidas, se representan con el criterio de la Tabla 56.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN PARA LAS CONCENTRACIONES MEDIDAS DEL AMOXICILIOL-OCTA-L-LISINA
Irritante
<p>Parte Inicial; La concentración es positiva para eritema y/o edema en al menos 1 de los animales</p> <p>Parte confirmatoria; La concentración es positiva para eritema/edema en al menos 2 de los animales.</p> <p>Criterios de positividad animal;</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Puntuación media a partir de las puntuaciones en 24, 48 y 72 horas tras la administración en cada animal. La clasificación para eritema o edema deberá ser ≥ 2, y deberá al menos obtener una clasificación más alta que la obtenida por el control negativo, al mismo tiempo en el animal correspondiente.</p>

Tabla 56. Criterios de clasificación para las concentraciones medidas de amoxiciloil-octa-L-Lisina. (OECD guideline N°16).

Ensayo inicial. Resultados obtenidos de las observaciones en vida

Clasificación de las reacciones en la piel

Después de la administración a las hembras ID1-2 y ID3-4 con las concentraciones 0,05, 0,1 y 1 mg/mL, y 5, 10 y 20 mg/mL, respectivamente, se observaron resultados leves en la piel.

El animal ID1 mostró un leve eritema calificado como 1 desde el día 1 al 4, después de la administración en el sitio de inyección con la concentración testada de 0,05 mg/mL. Idéntica reacción de la piel con la misma concentración fue presentada por el animal ID2, así en este caso el enrojecimiento solamente se observó durante el día 1 y 2 después de la administración.

En resumen, el animal ID3 presentó un enrojecimiento y descamación del flanco derecho craneal y área caudal, en la zona de la espalda que abarca la inyección con las concentraciones 5 y 10 mg/mL, siendo un grado 2 para eritema. Esta reacción en la piel era más ligera con un eritema grado 1, durante los días 5 y 6 después de la administración y se resolvió a partir de ese momento.

Resultados

Además, acorde a los criterios de clasificación, ninguna de las concentraciones testadas fue irritante y la concentración máxima no irritante testada en la parte inicial fue de 20 mg/mL. Siendo esta la concentración seleccionada y administrada en los animales en la parte confirmatoria.

Mortalidad y los signos clínicos generales

No se observaron signos clínicos, ni mortalidad, presentando un comportamiento normal los animales durante el período de observación. Sin embargo, se observó una disminución de la actividad en el animal ID1 hasta dos horas después de la administración. Este signo clínico menor pudo atribuirse al stress del animal causado por la manipulación y no por el tratamiento.

Peso Corporal

Los animales mostraron la curva de peso corporal sin alteraciones para esta especie y sexo de ratas.

Ensayo confirmatoria: Resultados obtenidos de las observaciones en vida

Clasificación de las reacciones de la piel

La concentración máxima no irritante (MNIC) seleccionada en el ensayo inicial fue de 20 mg/mL y se administró a los animales en tres sitios diferentes de la espalda.

Después de la inyección, sólo la hembra ID6 mostró un eritema grado 1 en el lugar de la inyección durante los tres días posteriores a la administración. Por otra parte, estos animales además presentaron descamación en el área, en la zona fuera de la inyección, entre los días 5 y 6 después de la administración y una herida en la zona de la inyección craneal derecha desde el día 3 al 7 después de la administración. Este último hallazgo podría ser originado por un rasguño producido por el propio animal, o por otro animal de la misma jaula.

Adicionalmente, se observó en el macho ID3, una herida en el área caudal derecha, pero fuera de la zona de inyección del elemento de prueba, durante el día 4 después de la administración. Esta lesión se resolvió en el día 7 después de la administración y no se observaron más reacciones en la piel. El animal ID6, tenía un rasguño producido por el mismo animal o por otros animales de la misma jaula.

Mortalidad y signos clínicos generales

No se observaron signos clínicos, ni mortalidad, presentando un comportamiento normal los animales durante el período de observación. Sólo el animal ID6 presentó rinorrea a los 30 minutos después de la administración. Este signo clínico pudo atribuirse al stress del animal causado por la manipulación y no por el tratamiento.

Peso corporal

Los animales mostraron la curva de peso corporal esperada para esta especie y sexo de ratas.

Ensayo confirmatoria. Resultados obtenidos de la necropsia

Ninguna anomalía fue encontrada en la evaluación macroscópica y en la necropsia de los órganos y tejidos.

Así las conclusiones del ensayo de toxicidad aguda fueron;

- **Ensayo inicial:** En un primer tratamiento se testaron las concentraciones 0,05; 0,1 y 1 mg/mL. Se utilizaron dos hembras, cada uno de las cuales recibió una inyección de cada una de las tres concentraciones, además de otra de vehículo. No se observaron signos clínicos sistémicos, ni efectos locales en ninguno de los puntos de inyección. Por tanto, al cuarto día de ensayo, se procedió a ensayar las 3 concentraciones superiores, 5, 10 y 20 mg/mL. Se utilizaron otras dos hembras (distintas a los animales incluidos en el tratamiento anterior). También en este caso, cada animal recibió una inyección de cada una de las tres concentraciones, además de una inyección vehículo. Las reacciones cutáneas presentadas fueron clasificadas como leves de resolución espontáneas; eritemas de grado 1 y 2. Atendiendo a los criterios de clasificación establecidos en el protocolo de estudio, ninguna de las concentraciones probadas fue irritante.
- Por tanto, se procedió a realizar en **ensayo confirmatorio** con la concentración de 20 mg/mL. En este caso se incluyeron 5 machos y 5 hembras. Cada animal recibió 3 inyecciones del producto de ensayo a la concentración de 20 mg/mL y una inyección de vehículo. Durante la fase confirmatoria no se observaron signos clínicos locales ni sistémicos en ninguno de los animales.
- No se observó mortalidad, ni signos clínicos y los animales mostraron un comportamiento normal durante el período de observación. Los animales mostraron la curva de peso corporal esperada y no se encontraron anomalías en la necropsia y ni en la evaluación macroscópica de los órganos y tejidos.
- Conforme a estos resultados la concentración máxima no irritante (MNIC) para la molécula de APL está por encima de 20 mg/mL.

2.2 Toxicidad subaguda. Resultados a dosis repetidas

La evaluación de la seguridad se basó en observar mortalidad, signos clínicos locales y generales, peso corporal y consumo de alimentos para todos los animales durante el conjunto del estudio. Además las determinaciones clínicas patológicas que se llevaron a cabo durante la semana 4 y 6 del período de estudio. La evaluación de la seguridad también se basó en una necropsia final, con el peso de los órganos así como en una evaluación histopatológica.

Resultado obtenido de las observaciones en vida

Clasificación de las reacciones de la piel

Ni la molécula testada Amoxiciloil octa-L-lisina, ni el vehículo de referencia fueron clasificados

Resultados

como irritantes, la puntuación media para eritema y edema para cada uno de las dos administraciones fue en todos los casos <2. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 57.

Grupo	Tratamiento	Puntuación media eritema			Puntuación media edema		
		Día 1	Día 15	Día 29	Día 1	Día 15	Día 29
A	PBS	0,04	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
B	APL 0,5mg/mL	0,11	0,06	1,17	0,04	0,07	0,00

Tabla 57. Puntuación media de eritema y edema.

Para el PBS (vehículo de referencia), las reacciones locales menores que fueron observadas en el sitio de inyección, correspondían para los machos con eritema después de cada administración. Estas reacciones no fueron notables y fueron probablemente asociadas con la presión dérmica del volumen de inyección.

Para el Amoxiciloil octa L-lisina 0,5 mg/mL, se observó una reacción local menor y transitoria después de la primera y segunda administración (día 1 y 15) similar a la reacción observada con el PBS sólo. Estos signos se observaron en casi la mitad de los puntos de inyección, con una respuesta variable que se encuentra desde un sitio de inyección a otro punto de inyección, dentro del mismo animal. Así las reacciones reportadas después de la primera y segunda administración de Amoxiciloil octa L-lisina no fueron notables, y fueron probablemente asociadas con la presión dérmica del volumen de inyección.

Sin embargo, la incidencia y severidad de las reacciones locales se incrementaron después de la tercera administración (día 30). Los machos desarrollaron además eritema (grado 1 al 2) en casi la mitad de los sitios de inyección dentro de la primera semana después de la administración. En el caso de las hembras, durante este período el eritema observado fue de grado 1 al 3 en casi todos los sitios de inyección, mostrando de nuevo una alta intra e inter variabilidad animal. Al final del período de recuperación (día 44). Los signos mencionados fueron observados en animales de ambos sexos.

Dado que la puntuación media global del grupo para la tercera administración fue de 2, en general, la formulación puede ser considerada no irritante.

Signos sistémicos clínicos

Sólo signos clínicos leves y transitorios (como heridas en la espalda o cuello) se manifestaron al azar en animales de todos los grupos de experimentación. Estos signos no fueron considerados relevantes. En particular, la presencia de heridas en la espalda de algunos animales (localizado en diferentes áreas de inyección) se atribuyó al procedimiento de afeitado que es realizado antes de cada administración.

Mortalidad

No se registró mortalidad durante el período del estudio.

Peso corporal

Ningún efecto relacionado con el peso corporal o la ganancia de peso corporal se observó a lo largo del estudio y en ninguno de los dos grupos experimentales.

Consumo de alimentos

No se observaron diferencias notables entre los animales de los dos grupos experimentales, en el consumo diario de alimentos durante todo el período de estudio.

Anatomopatología Clínica

Valoraciones Hematológicas

No existieron diferencias significativas en los parámetros hematológicos entre los animales tratados con el vehículo y aquellos tratados con APL. Se observaron algunas diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, estas fueron consideradas carentes de importancia toxicológica.

Parámetros Bioquímicos

No existieron diferencias biológicas relevantes inter grupo a nivel de parámetros bioquímicos clínicos, al comparar entre el grupo control y el grupo tratado con APL. No obstante, hay que destacar que se registraron algunas diferencias esporádicas estadísticamente significativas a nivel de parámetros bioquímicos, durante todo el período del estudio, pero fueron de magnitud menor, y por tanto se consideraron carentes de importancia toxicológica y no relacionado con el tratamiento.

Investigación Terminal. Resultados obtenidos de la necropsia

En el sacrificio terminal, la presencia de un hematoma subcutáneo en una de las zonas de inyección se mostró en una de las hembras ID30, así como en una hembra perteneciente al grupo tratado con el PBS ID32. Este hecho se consideró relativo al procedimiento técnico de inyección pero no al material inyectado en sí mismo.

No se observaron otros hallazgos macroscópicos en el sacrificio terminal.

En relación al peso de los órganos, sólo se encontraron algunas diferencias aisladas estadísticamente significativas de peso en los órganos absolutos y relativos a la hora del sacrificio terminal. Estos hallazgos aislados no fueron considerados toxicológicamente relevantes, ni relacionados con el producto de ensayo.

Desde un punto de vista de histopatología, no se encontraron diferencias biológicamente relevantes inter grupo en la histomorfología de los órganos; bazo, timo y ganglio linfático

Resultados

mesentérico. Igualmente se compararon los grupos tratados con el PBS (vehículo de referencia) y con la molécula de APL a nivel de ganglios linfáticos axiliares e inguinales, sin encontrarse ningún resultado histológicamente relevante.

En los órganos linfáticos evaluados la gama y severidad de todos los hallazgos indicó que correspondían a hallazgos que habitualmente se han visto en ratas no tratadas, de la misma edad y la tensión mantenida en condiciones experimentales.

Así las conclusiones del ensayo de toxicidad subaguda fueron;

- No hubo mortalidad relacionada con el tratamiento y ningún animal mostró signos clínicos sistémicos atribuibles al producto en investigación o los controles. Además, no se observó ninguna diferencia biológicamente significativa en el peso corporal, la ingesta de alimentos y los resultados de patología clínica obtenida durante el período de estudio. Del mismo modo, en la necropsia no se evidenciaron cambios de peso de los órganos entre los animales tratados con el vehículo de referencia (PBS), y el producto de ensayo (APL; 0,5 mg/mL).
- Conforme a la clasificación interna de los criterios, establecida en base a la OECD N°16 “Series on testing and assessment” ni el producto en investigación ni los controles fueron clasificados como no irritantes. En los grupos de recuperación la media de la clasificación para eritema y/o edema fue en todos los casos <2.
- Después de la tercera administración de la molécula de APL (0,5 mg/mL) la incidencia y gravedad de las reacciones locales tendieron a aumentar, sin alcanzar una magnitud relevante con una puntuación media <2, así se clasificaron como no irritantes de acuerdo con la clasificación interna de criterios establecida y basada en OECD guideline. Estos resultados fueron completamente reversibles después de pasadas 2 semanas del período de recuperación, así no se encontró ninguna explicación para el ligero aumento y gravedad de las reacciones locales, pero dado que sólo ocurren después de la tercera administración se ha considerado no relacionado con la irritación.
- En relación a las reacciones cutáneas locales:
 - En el grupo control (vehículo PBS): no se observaron reacciones locales reseñables. En los machos, se registraron ocasionalmente eritema/edema de grado 1, mientras que en las hembras se observaron heridas superficiales después de cada administración. Las reacciones se consideraron sin interés y probablemente asociadas a la presión dérmica relacionada con el volumen de la inyección, rapidez de la inyección, entre otros.
 - En el grupo experimental (APL 0,5 mg/mL): los animales tratados con el producto en investigación mostraron unas reacciones locales menores y transitorias después de la primera y segunda administración (días 1 y 5), que fueron similares a las observadas con el vehículo (PBS). Las reacciones se consideraron sin interés y probablemente asociadas a la presión dérmica debida al volumen de la inyección. La incidencia y la gravedad de las reacciones locales aumentaron

después de la tercera administración, con presencia de eritema en un rango de grado entre 1 y 3. Al final del período de recuperación (día 44) los animales de ambos sexos se habían prácticamente recuperado y no presentaban ninguno de los signos descritos anteriormente.

- Tanto en el sacrificio terminal como en el de recuperación, no había ninguna indicación de cualquier cambio relacionado con el tratamiento en los órganos linfoides evaluados; bazo, timo, ganglio linfático mesentérico, ganglio linfático axilares, ganglios linfáticos inguinales.
- En conjunto estos resultados indican que, en las condiciones ensayadas, la administración repetida intermitente (3 veces) de APL, en machos y hembras de ratas Sprague Dawley durante un período de 29 días (días 1, 15 y 29), a una concentración de 0,5 mg/mL y utilizando un volumen de administración de 120 μ L por dosis/día y por animal (administrado en 4 sitios diferentes, 30 μ L/sitio) fue bien tolerada después de la primera y segunda administración realizadas en los días 1 y 15 respectivamente. Solamente se encontraron lesiones locales leves, que fueron en todos los casos similares a las observadas en el grupo control, lo que sugiere que los efectos pueden estar relacionados con el procedimiento de administración.
- Finalmente, no se encontraron indicios de toxicidad sistémica en ninguno de los grupos experimentales.

3. Modelos celulares: Liberación de Histamina (HR)

La técnica de liberación de histamina es una técnica funcional “ex vivo”, que permite valorar la liberación de este mediador por los basófilos al enfrentarse a un alérgeno.

La histamina liberada es adsorbida por la matriz de fibra de vidrio (altamente afín y selectiva) y posteriormente detectada fluorometricamente (método-OPA). La clasificación está basada en la mínima concentración de alérgeno capaz de inducir una liberación de histamina por encima del punto de corte de la técnica.

Los resultados se han obtenido realizando la técnica de sensibilización pasiva y están basados en el sistema de clasificación de RefLab, en el que se establecen unos rangos de liberación de histamina que se correlacionan con la sensibilización del paciente al extracto alérgico ensayado.

El estudio incluyó 29 pacientes, de los cuales 19 presentaron reacciones de hipersensibilidad inmediata a la Amoxicilina en el último año, con pruebas cutáneas positivas y/o IgE específica para Amoxicilina. Como control del ensayo, se incluyeron 10 individuos sanos que habían tolerado una dosis terapéutica de Amoxicilina. Las características clínicas y los resultados de las pruebas cutáneas de los pacientes con hipersensibilidad a la Amoxicilina se muestran en la Tabla 58.

Resultados

Pacientes	Edad años	Sexo	Reacción	IgE Amoxicilina	Intervalo de reacción (minutos)	Pruebas cutáneas con amoxicilina (SPT o ID, diámetro mayor de pápula mm)
1	24	F	Anafilaxia	1,14	5 min	NR
2	31	M	Urticaria	3,37	5 min	SPT: 6 mm
3	57	M	Anafilaxia	2,24	10 min	SPT: 8 mm; ID 10 mm
4	36	F	Anafilaxia	0,95	15 min	ID: 11 mm
5	33	F	Anafilaxia	1,28	18 min	NR
6	22	M	Urticaria	1,65	10 min	SPT: 6mm
7	64	M	Eritema + Prurito	3,57	30 min	SPT: N; ID: 10 mm
8	49	M	Dermatitis	6,03	60 min	SPT: N
9	53	M	Anafilaxia	5,97	90 min	SPT: 5 mm
10	66	M	Urticaria	>100	55 min	SPT: N; ID: N
11	56	M	Urticaria	7,03	60 min	SPT: N; ID: 9 mm
12	35	M	Anafilaxia	5,26	30 min	SPT: N
13	69	M	Urticaria	3,76	No conocido	SPT: N; ID: 9 mm
14	47	M	Anafilaxia	0,85	30 min	NR
15	51	F	Eritema	5,89	60 min	SPT: 8 mm
16	28	F	Urticaria	0,84	60 min	SPT: 6 mm
17	57	M	Urticaria	0,81	10 min	NR
18	62	M	Anafilaxia	0,76	5 min	SPT: 7 mm
19	74	F	Anafilaxia	3,86	10 min	NR

Tabla 58. Características clínicas y demográficas de pacientes positivos; pruebas cutáneas con amoxicilina a una concentración de 20 mg/mL (diámetro mayor de pápula, mm).

SPT; "Skin prick Test" ID; Intradermo reacción.

F: Femenino; M: Masculino; NR: No Realizado. N: Negativo

La mediana de la edad de la población sensibilizada a Amoxicilina fue de 51 años (RI: 33-62), el paciente con menor edad tenía 22 años y el paciente más mayor tenía 74 años. El 31,6% eran mujeres y el 68,4% eran hombres. Como reacción al antibiótico, 7 pacientes (36,8%) desarrollaron urticaria, 9 pacientes (47,4%) sufrieron anafilaxia, el resto de pacientes sufrieron otras alteraciones dermatológicas de distinta graduación. La mediana del intervalo de tiempo que transcurrió entre la reacción al antibiótico y la inclusión en el estudio fue de 90 días (RI: 60-240), mientras que la mediana del tiempo transcurrido entre la ingesta del medicamento y el desarrollo de la reacción fue de 24 minutos (RI: 10-60), en la que el paciente con menor intervalo de reacción fueron 5 minutos y el paciente con mayor intervalo de reacción fueron 90 minutos.

La sensibilización de los pacientes a la Amoxicilina fue confirmada por "skin prick test" (SPT) en 7 pacientes, por pruebas intradérmicas (ID) en 3 pacientes, y 8 de los pacientes fueron diagnosticados por determinación de IgE específica frente a Amoxicilina. De ellos, 4 de los pacientes presentaron pruebas cutáneas negativas, sin embargo tenían niveles significativos de IgE específica a Amoxicilina, por lo que se decidió incluirlos en el ensayo.

Ningún paciente desarrolló reacción sistémica después de la prueba cutánea.

El estudio incluyó 10 pacientes como sujetos control, el criterio de selección para su inclusión

fue que tuvieran valores inferiores a 0,35 kUA/L en la determinación de IgE específica frente Amoxicilina, por lo que no se realizaron pruebas cutáneas.

Las características clínicas y demográficas, para aquellos pacientes que fueron negativos se describen a continuación en la Tabla 59:

Pacientes	Edad años	Sexo	IgE Amoxicilina
1	45	M	0,03 kUA/L – Clase 0
2	48	F	0,07 kUA/L – Clase 0
3	37	F	0,01 kUA/L – Clase 0
4	32	M	0,01 kUA/L – Clase 0
5	23	M	0,03 kUA/L – Clase 0
6	33	F	0,10 kUA/L – Clase 0
7	47	F	0,01 kUA/L – Clase 0
8	28	M	0,01 kUA/L – Clase 0
9	44	F	0,03 kUA/L – Clase 0
10	27	F	0,04 kUA/L – Clase 0

Tabla 59. Características clínicas y demográficas de pacientes negativos.

La mediana de edad de la población seleccionada como negativa Amoxicilina fue de 40,5 años (RI: 31-47), en la que el paciente con menor edad tenía 23 años y el paciente más mayor tenía 48 años. El 60% eran mujeres y el 40% eran hombres.

Para la realización del test de liberación de histamina, se determinó la concentración máxima de Amoxicilina y la molécula de APL, que producía una liberación de histamina específica por parte de los basófilos. Esta concentración se estableció en 0,005 mg/ml tanto para Amoxicilina como para la molécula de APL.

Los basófilos de los 19 pacientes positivos, fueron estimulados tanto con Amoxicilina como con APL a 0,005 mg/mL, obteniéndose una liberación específica de histamina, en valores de ng/mL. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 60.

Resultados

HRT (concentración histamina, ng/ml)					
Pacientes	AMOXICILINA	APL	Pacientes	AMOXICILINA	APL
1	15	17,5	11	12,5	17,5
2	19,5	21,5	12	17,5	22,5
3	18	22	13	15	22
4	27	26	14	8	13
5	21	18,5	15	7	4
6	30	23,5	16	4,5	11
7	27,5	25	17	6	5,5
8	27,5	24,5	18	5,5	3
9	22	17,5	19	3	24,5
10	21,5	19,5			

Tabla 60. Concentración de histamina en pacientes positivos.

En la Tabla 61 se muestra el resumen de los datos obtenidos de liberación de histamina, después de estimular los basófilos con la Amoxicilina y con la molécula de APL.

AMOXICILINA			APL	
	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles
Media	16,16	11,2	17,82	8
Intervalo de confianza (95%)	11,97-20,35	8,94-13,46	14,32-21,31	5,84-10,16
Desviación típica	8,69	3,16	7,25	3,02
Mínimo	3	5,5	3	3,5
Percentil al 25%	7	8,86	13	5,13
Mediana	16,5	12	19,5	8
Percentil al 75 %	22	12,5	23,5	11
Máximo	30	17	26	12

Tabla 61. Datos obtenidos de liberación de histamina.

Se determinó la correlación existente entre la molécula de APL y la Amoxicilina en la técnica de liberación de histamina. En la figura 52 se puede apreciar como la correlación entre ambas moléculas es alta, con una r de Spearman de 0,631 y un p -valor de 0,004, lo que hace indicar que los basófilos liberan histamina de una forma similar al ser estimulados por ambas sustancias, denotando la especificidad de la molécula de APL y su analogía con la Amoxicilina.

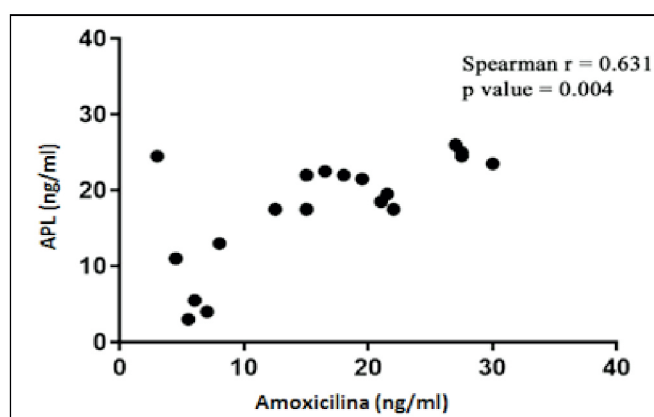


Figura 52. Correlación entre la molécula de APL y Amoxicilina para los nanogramos de histamina liberada

En la Figura 53 se puede apreciar como con ambas sustancias se obtiene un diagnóstico discriminante entre los pacientes sensibilizados y los controles, ya que en ambos casos la comparación de la mediana de liberación de histamina de los pacientes sensibilizados, es claramente superior a la de los controles, siendo en ambos casos estadísticamente significativa esta diferencia.

La mediana de liberación de histamina con la molécula de APL es superior a la obtenida con la Amoxicilina, 19,5 frente a 16,5 respectivamente. Siendo también mayor la diferencia en la liberación de histamina de los pacientes frente a los controles, con una diferencia de 4,5 ng/ml en el caso de la Amoxicilina, un 27% más de señal en los pacientes positivos. Aumentando a 11,5 ng/ml cuando se utiliza APL, siendo un 59% superior la señal de los pacientes positivos.

Basándonos en estos datos, se puede decir que la utilización de la molécula de APL permite un diagnóstico más fiable y concluyente que utilizando la Amoxicilina.

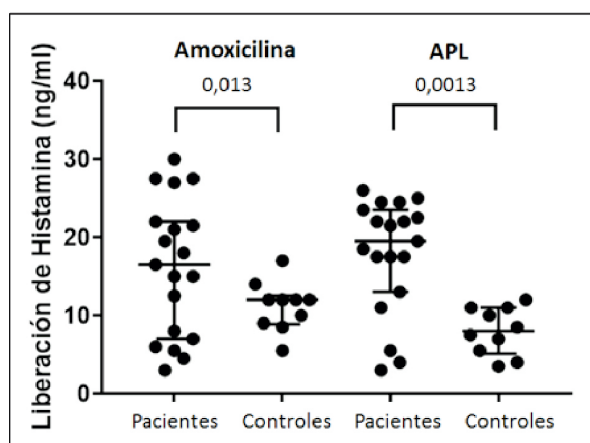


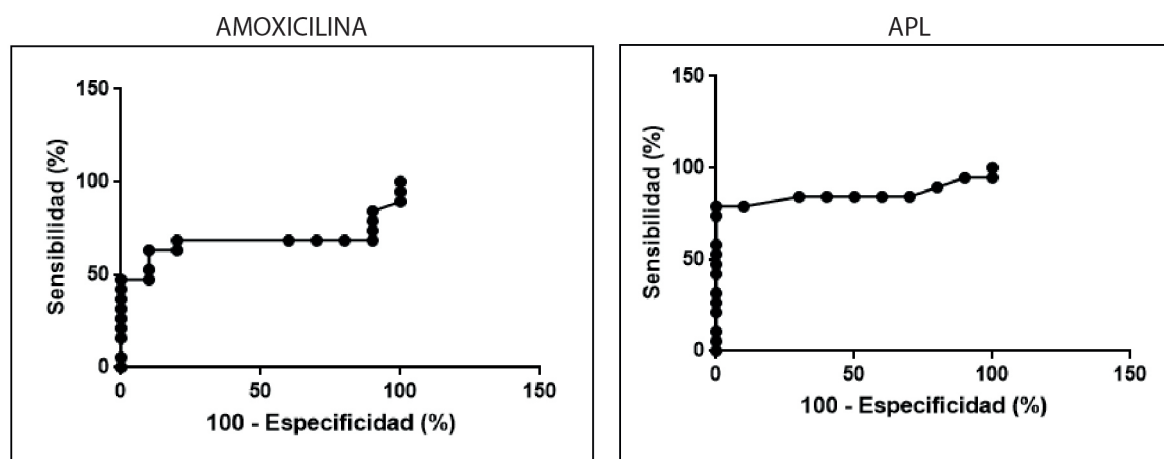
Figura 53. Comparación de resultados de la técnica liberación de histamina (HRT) para Amoxicilina y la molécula de APL entre pacientes y controles.

Se realizó el análisis de las curvas ROC para determinar el valor óptimo de punto de corte para la técnica con cada una de las moléculas utilizadas. En dicho análisis se determinaron 14,5 ng/ml de histamina liberada como punto de corte de la técnica utilizando Amoxicilina para la

Resultados

estimulación de los basófilos, mientras que en el caso de la utilización de la molécula de APL se fijó en 12,5 ng/ml de histamina liberada en el punto de corte. Los resultados se muestran en la Figura 54 y en la Tabla 62.

Con este análisis hemos podido determinar que la molécula de APL ofrece una mayor sensibilidad y especificidad que la Amoxicilina, siendo esta última de menor utilidad en la técnica ya que solo alcanza una sensibilidad del 63,16% frente a un 78,95 % de sensibilidad obtenido con la molécula de APL. Alcanzándose a la vez una mayor especificidad con la molécula de APL (100%) que con Amoxicilina (90%).



AMOXICILINA			APL		
Cut-off	Sensibilidad %	Especificidad %	Cut-off	Sensibilidad %	Especificidad %
> 8,75	68,42	20	> 8	84,21	50
> 9,5	68,42	30	> 9,25	84,21	60
> 11	68,42	40	> 10,5	84,21	70
> 12,25	68,42	80	> 11,5	78,95	90
> 13,25	63,16	80	> 12,5	78,95	100
> 14,5	63,16	90			
> 15,75	52,63	90			

Figura 54 y Tabla 62. Curvas ROC generadas después de la comparación de amoxicilina y APL en la técnica de liberación de histamina de pacientes alérgicos vs pacientes no alérgicos.

4. Programa clínico; resultados del ensayo clínico

Se realizó un ensayo clínico para estimar la concentración de la molécula de APL que produce un resultado positivo en pruebas cutáneas, basado en los “Position Paper” de la ENDA (“Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics” Allergy. 2004; 59: 1153-1160) y la guía de Evaluación de Diagnósticos (“Guideline on Clinical Evaluation of Diagnostic Agents”. CPMP/EWP/1119/98/Rev 1).

Se seleccionaron pacientes alérgicos a aminopenicilinas, pacientes positivos. La prueba experimental se desarrolló en todos ellos siguiendo el protocolo establecido. La variable desenlace “gold standard”, esto es, la presencia o ausencia de la enfermedad, se determinó mediante la historia clínica del paciente, pruebas cutáneas positivas y/o IgE específica para Amoxicilina. Como variable predictiva se utilizó el diámetro mayor de pápula.

Los resultados fueron analizados para estimar los valores de sensibilidad para el punto de corte estándar del crecimiento del diámetro mayor de pápula de 3 mm, según las recomendaciones de la ENDA.

El análisis de los resultados comenzó con una descripción de las características de la población incluida en el estudio, la asignación de los pacientes según su clasificación previa y el resultado de las pruebas diagnósticas, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 63.

Paciente	Edad (años)	Sexo (M/F)	Descripción reacción alérgica	IgE específica (kU/l)	Resultado “prick test” AMX 20 mg/mL
01	46	F	Anafilaxia	2,96	N
02	56	F		14,7	P
03	35	F		0,22	P
04	57	M	Urticaria	7,05	N
05	43	F		0,15	P
06	51	F		3,41	P
07	58	M		0,13	P
08	40	F	Urticaria, prurito, angioedema	9,61	NR
09	59	M		NR	P
10	38	F		0,02	P
11	43	F	Otras manifestaciones clínicas (angioedema, eritema, disnea...)	0,04	P
12	52	F		1,51	N
13	57	M		0,32	P
14	38	F		0,13	P
15	37	F		0,02	P

Tabla 63. Características demográficas y manifestaciones clínicas de los pacientes (n=15).

NR; No realizado, N; Negativo, P; Positivo. M; Masculino, F; Femenino.

El número de pacientes que formó parte del estudio fue de 15 pacientes (n=15 casos), todos ellos eran pacientes alérgicos a las aminopenicilinas. No hubo ningún paciente excluido. La media de edad de la población final del ensayo clínico fue de 47,3 años, con una desviación típica de 9 años, con un rango desde los 35 hasta los 59 años. El 26,6% (n=4) de la población eran hombres frente a un 73,3% (n=11) de mujeres.

De los pacientes incluidos en este ensayo, 11 presentaban IgE específica a Amoxicilina (>0,07kUA/L). De los otros 4 casos, 3 tenían una IgE específica inferior a 0,07 kUA/L y en el último caso no se realizó el análisis, pero todos ellos tenían una historia clínica sugestiva de reacciones de hipersensibilidad de tipo II con Amoxicilina.

Resultados

El 53% de las manifestaciones clínicas de los pacientes alérgicos fueron de origen cutáneo, divididas como urticaria (26,5%) y prurito (26,5%) mientras que sólo un 20% presentó anafilaxia (n=3, todos del sexo femenino).

Los resultados de todos los pacientes incluidos en este ensayo para la prueba “skin prick test” con la molécula de APL, para las concentraciones de 0,01 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL y 0,5 mg/mL fueron negativos en todos los casos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 64, para las concentraciones de 0,05; 0,01; 0,5 mg/mL para la prueba intradérmica con la molécula de APL.

Paciente.	Resultado vía ID APL (concentraciones positivas mg/mL).	Tiempo desde reacción (meses).
01	P (0,05;0,1;0,5)	1,5
02	P (0,01;0,05)	2
03	P (0,5)	4
04	P (0,5)	4
05	P (0,5)	6
06	P (0,01; 0,05)	7
07	P (0,5)	7
08	P (0,5)	4
09	P (0,5)	27
10	P (0,5)	29
11	P (0,5)	5
12	P (0,01; 0,05)	5
13	P (0,1; 0,5)	5
14	P (0,5)	4
15	N	4

Tabla 64. Resultados obtenidos con las pruebas de APL intradérmico de los pacientes (n=15).
N; negativo P; positivo.

Concentración	Verdaderos positivos	Falsos negativos	Sensibilidad %	IC 95%
0,01	3	12	20	0-43,6
0,05	4	11	26,7	0,95-52,4
0,1	5	10	33,3	6,14-60,52
0,5	14	1	93,3	77,4-100

Tabla 65. Resultados obtenidos de sensibilidad en el ensayo clínico.

Como se puede apreciar en la tabla 65, las concentraciones de la molécula de APL de entre 0,01 y 0,1 tienen un escaso poder diagnóstico y por tanto no tienen utilidad en el diagnóstico in vivo por intradérmico reacción, de hipersensibilidad Amoxicilina y derivados. Esto se pone de manifiesto por la sensibilidad obtenida con estas concentraciones, no siendo superior al 33,7%,

no siendo admisible tal % en un diagnóstico de estas características.

Sin embargo con la concentración de 0,5 mg/ml se consigue diagnosticar a 14 de los 15 pacientes participantes, obteniéndose así un 93,3% de sensibilidad, siendo éste un % de sensibilidad bastante alto y que permite pensar en esta molécula como una alternativa en el diagnóstico por intradermo reacción en pacientes sensibilizados a Amoxicilina y derivados. En el caso del paciente que fue negativo con esta concentración, se da el caso de que presentaba una IgE específica $<0,07$ kUA/L, por lo que cabe la posibilidad que sus reacciones frente al antibiótico no sean IgE mediadas y por lo tanto no es apto para este tipo de diagnóstico.

En este ensayo clínico las manifestaciones cutáneas suponen el 77% de las reacciones con un 44% (n=8) que presentaban urticaria y un 33% (n=6) con prurito. De los que presentaron urticaria (IgE específica $2,92 \pm 3,96$ kU/I), 7 mostraron positividad para la concentración de 0,5 mg/mL APL por vía intradérmica y 1 para 0,01 y 0,05 mg/mL APL intradérmico. Los tres casos clasificados como anafilaxia (IgE específica $5,96 \pm 7,69$ kU/I) también presentaron resultados positivos con la administración intradérmica de la molécula de APL (1 caso positivo 0,05; 0,1 y 0,5 mg/mL; 1 caso positivo con 0,01 y 0,05 mg/mL y 1 positivo para 0,5 mg/mL) mientras que sólo dos de ellos fueron positivos en las pruebas cutáneas realizadas con Amoxicilina 20 mg/mL.

En cuanto a los resultados de seguridad, en los 15 pacientes que componen la población final de estudio no se observó ninguna reacción adversa con las técnicas diagnósticas empleadas. Los acontecimientos adversos que se produjeron no estaban relacionados con la administración de la molécula de APL, con lo que se demuestra que la aplicación de la molécula de APL mediante “skin prick test” y vía intradérmica, es bien tolerada a las diferentes concentraciones analizadas.

DISCUSIÓN

Servicios de alergología (Kanny et al., 2005; García et al., 2012). Aunque los antibióticos β -lactámicos son los de mayor uso, debido a su eficacia terapéutica y escasa toxicidad, las reacciones alérgicas a ellos siguen siendo una de las razones principales de consulta médica tanto en centros hospitalarios como en consultas médicas. (Antúnez et al., 2006; Barberan et al., 2008).

Las reacciones alérgicas a β -lactámicos tienen un impacto socio-económico significativo, tanto en costes directos como en indirectos, especialmente complicado por los cambios en el consumo de estos antibióticos (Solensky, 2014). Así, la realización de un diagnóstico preciso de la alergia a β -lactámicos se manifiesta como necesaria. Sin embargo, los métodos disponibles hoy en día como las pruebas “skin prick test” o las pruebas de provocación requieren mucho tiempo, necesitan de personal cualificado médico y no están libres de riesgo (Torres et al., 2003; Blanca et al., 2009).

A pesar de haber mejorado el proceso de producción de β -lactámicos en los últimos años, el número de reacciones no ha disminuido, probablemente debido a que el número de sujetos expuestos a estos medicamentos ha aumentado, si bien es cierto que los patrones de consumo de los antibióticos han cambiado con el tiempo. Así, un estudio (Cars et al., 2001) realizado a principios de siglo sobre su uso general en Europa demostró que la Penicilina no era el antibiótico β -lactámico más consumido, siendo la Amoxicilina y las Cefalosporinas las que han aumentado el número de reacciones, y su prevalencia parece diferir entre las poblaciones y los países. Así la anafilaxia asociada a β -lactámicos suele ser poco frecuente en Europa Central y más común en el sur de Europa. Sin embargo, el uso prolongado de la Penicilina sí ha permitido el desarrollo de reactivos válidos para las pruebas “skin prick test”, reactivos que desarrollan anticuerpos IgE específicos de Penicilina.

La Penicilina ha dejado paso en los hábitos de consumo a la Amoxicilina, y es la alergia selectiva a la **Amoxicilina**, la causa más frecuente de alergia a β -lactámicos actualmente (Torres et al., 2016), representando en nuestro país más del 70% de los casos (García et al., 2012). Es por ello que algunos autores (Khan et al., 2010) consideran que la Amoxicilina debe incluirse en el panel de pruebas cutáneas cuando hay pacientes que reportan reacciones a los antibióticos β -lactámicos.

En base a estas consideraciones se puede inferir que los cambios en el uso y la elección de β -lactámicos, en particular el aumento del uso de Amoxicilina, han causado modificaciones epidemiológicas en la población alérgica a estos medicamentos, y justifica una revisión de pautas para el diagnóstico.

Desde 1980 se han sucedido una serie de evidencias que han demostrado que la cadena lateral de la Amoxicilina podría ser la parte relevante de la estructura del determinante alergénico (Blanca et al., 1990; Torres et al., 2001). Así, la adición de Amoxicilina al panel de haptenos para las pruebas de la piel ha sido apoyada en diferentes estudios (Antúnez et al., 2006; Torres et al., 2003; Bousquet et al., 2005) y en la actualidad está recomendado su inclusión por la Red Europea de alergia a medicamentos (ENDA) para las pruebas cutáneas en la piel.

En la línea con estos trabajos, y con la trayectoria científica de nuestro grupo de investigación,

hemos realizado por primera vez la síntesis de un derivado hapténico de la Amoxicilina sódica; fruto de la unión de 8 cadenas de lisina, unidas cada una de ellas a un resto de amoxiciloico. Esta molécula se denomina **Amoxiciloil octa L-Lisina (APL)**.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha planteado como el estudio de la capacidad diagnóstica tanto “in vitro” como “in vivo” de la molécula de APL, en pacientes con reacciones alérgicas inmediatas a la Amoxicilina y su posible aplicación en los algoritmos de diagnóstico de la alergia a β -lactámicos. Se ha demostrado que la molécula Bencilpeniciloil octa L-Lisina es un compuesto estable, siendo útil en las pruebas de diagnóstico “skin prick test” (Fernández et al., 2013) en los algoritmos de diagnóstico de la alergia a β -lactámicos. Resulta tentador pensar que la molécula Amoxiciloil octa L-Lisina pueda ser sintetizada de una manera similar, y sea un nuevo reactivo empleado en el diagnóstico de este tipo de pacientes alérgicos.

Para llevarlo a cabo hemos establecido, en primer lugar una caracterización química de la molécula mediante técnicas de RMN e IR, hemos desarrollado y validado los métodos de valoración de sustancias relacionadas y de pureza, a través de un método cromatográfico de HPLC, y determinado el contenido en disolventes residuales y el contenido en humedad. Todos estos parámetros los hemos medido a lo largo de diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa, comprobando de esta manera la estabilidad de la molécula de APL y demostrando que se trata de una sustancia mucho más estable que la Amoxicilina sódica.

Una vez comprobada la estabilidad de la sustancia, procedimos a comprobar su perfil de seguridad en animales. Para ello se realizaron los ensayos de toxicidad aguda y subaguda en ratas Sprague Dawley. De esta manera calculamos la dosis máxima no irritante, y un posterior estudio de toxicidad a dosis repetidas, para asegurar que las respuestas de aumento de pápula obtenidas en el ensayo clínico posterior, fueron debidas a la respuesta IgE mediada de tipo I y no a una irritación no específica.

Avanzamos en el campo de la sensibilidad y eficacia “in vitro” a través de los resultados en basófilos: test de liberación de histamina (TRH), para finalmente demostrar datos de seguridad y eficacia de la molécula de APL en un ensayo clínico, con una población de 15 pacientes alérgicos a la Amoxicilina.

La **Amoxicilina** es una molécula de bajo peso molecular que, acorde con la teoría de los haptenos, no induce respuesta inmune a no ser que se una covalentemente a un portador, usualmente una proteína (Landsteiner and Jacobs, 1935) obteniendo así un tamaño suficientemente grande (López et al., 2007; Guengerich, 2011). A diferencia de otros fármacos, no precisa ser metabolizada para conjugarse con las moléculas transportadoras ya que es intrínsecamente reactiva gracias a la apertura espontánea de su anillo β -lactámico, con formación del derivado amoxiciloil. Su grupo carbonilo forma uniones amida, fundamentalmente con los grupos ϵ -amino de las moléculas de lisina de las proteínas plasmáticas o de la membrana celular (Ariza et al., 2012; Ariza et al., 2014; Ariza et al., 2015).

Los antibióticos β -lactámicos siguen siendo los causantes más frecuentes de reacciones alérgicas

mediadas por IgE (Torres et al., 2017). Aunque todos los antibióticos β -lactámicos pueden ser responsables de este tipo de reacciones, es la Amoxicilina sódica sola o en combinación con el ácido clavulánico los responsables más frecuentes (Doña et al., 2012; Torres and Blanca, 2010; Romano et al., 2015). La Amoxicilina sódica puede inducir reacciones selectivas, lo que implica que los pacientes reaccionan a este antibiótico mientras que toleran otro tipo de antibióticos β -lactámicos, como es el caso de la Penicilina sódica. Así la estructura de la cadena lateral es importante para el reconocimiento inmunológico (Miranda et al., 1996; Mayorga et al., 1995; Ariza et al., 2016).

El diagnóstico de reacciones alérgicas inmediatas para la Amoxicilina sódica se basa principalmente en pruebas de “skin prick test” ó pruebas de provocación. Las pruebas de “skin prick test” se realizan usando determinantes mayores y menores de Penicilina sódica, más Amoxicilina sódica. Sin embargo, la sensibilidad es menor del 70% en el diagnóstico de pacientes sensibles a la Amoxicilina (Torres MJ et al., 2001). Para incrementar la sensibilidad en la prueba “skin prick test”, se han usado compuestos derivados de la Amoxicilina sódica denominados determinantes menores: ácido amoxiciloico y dicetopiperacina, pero ninguno de ellos ha demostrado (Torres et al., 2010) una mayor sensibilidad. En base a estas consideraciones, se requieren nuevas estructuras que faciliten la sensibilidad del diagnóstico de hipersensibilidad inmediata a la Amoxicilina sódica, como es el caso de la molécula de APL.

La inestabilidad de los antibióticos β -lactámicos en soluciones ha representado un obstáculo importante en el desarrollo de la Amoxicilina y de otros antibióticos β -lactámicos. Así, la degradación o los estudios de estabilidad han sido de importancia primordial, no sólo por la disponibilidad en el mercado de los mismos, si no también para evaluar sus propiedades farmacocinéticas y sus reacciones adversas. También es interesante observar, la estabilidad o la velocidad de degradación de los diferentes miembros de la familia de β -lactámicos “in vivo” así como “in vitro”, siendo esta muy diferente.

El anillo β -lactámico es muy rígido y su ruptura de enlaces amida en presencia de ácidos está favorecida dando una matriz de productos complejos. Otros factores que también contribuyen a la inestabilidad de la Amoxicilina sódica son su grupo carbonilo β -lactámico y la cadena lateral de acilo. La modificación de pH afecta tanto a la solubilidad de la Amoxicilina, como a la velocidad de hidrólisis de la misma (Bhattacharyya and Cort, 1978). Podríamos decir que la Amoxicilina en forma de sal sódica es una molécula muy lábil, diseñada o evolucionada para una administración local.

Considerando varias premisas tales como: a) la autodestrucción de la molécula de Amoxicilina sódica, b) la incapacidad de unión de los determinantes menores para unirse covalentemente a las proteínas (lo que se llama inhibición irreversible), y c) la formación de conjugados de hapteno-proteína como proceso clave en la patogénesis de las reacciones alérgicas a la Amoxicilina, se desarrolla la molécula denominada **Amoxiciloil octa L-Lisina (APL)**.

La primera parte de este trabajo de investigación consistió en la elaboración de la **síntesis y caracterización** de la molécula de APL. Los **valores de pureza** obtenidos para los tres

experimentos de la molécula de APL se encontraban entre el 99% y el 101%, el contenido de **sustancias relacionadas** estaba por debajo del 2%, y la **cantidad de agua** ha sido inferior al 1,60%, en cada uno de los tres experimentos. Es sabido que el proceso de captación de agua por el sólido puede limitar la posterior degradación del principio activo, pero si comparamos estos parámetros con los obtenidos en la Amoxicilina sódica en las mismas condiciones, podemos afirmar que la molécula de APL es una molécula más estable y menos lábil. Esta afirmación se ve corroborada con los resultados de estabilidad en las condiciones de 5°C y de 25°C y 60% HR, durante 12 meses.

La molécula de APL es un polímero compuesto por 8 unidades monoméricas, la disposición en el espacio de estas unidades no es equivalente y presenta un desplazamiento químico atribuible a una variación en el entorno, lo cual puede significar la no equivalencia de disposición, en el espectro de **resonancia magnética nuclear**. Los monómeros Lysamoxiciloico que se encuentran al final de la cadena presentan un comportamiento diferente a los monómeros Lys-amoxiciloico que se encuentran en el centro de la molécula. Esta ha sido la principal dificultad para asignar cada señal. En cuanto al espectro de **IR**, éste ofreció resultados conformes a la configuración esperada.

Se han desarrollado métodos analíticos específicos tanto de valoración pureza como de sustancias relacionadas específicas para la molécula de APL, métodos que suponen una actualización de los existentes, acordes con el estado del conocimiento actual y más sencillos de llevar a cabo que los descritos en Farmacopea Europea para la Amoxicilina sódica.

Tanto para la valoración de pureza, como la valoración de sustancias relacionadas, la técnica ha resultado ser lineal, dentro de los límites de intervalo ensayados, con un coeficiente de correlación superior al 0,99%. Para la exactitud se ha trabajado con porcentaje de recuperación, comprobándose que no existen diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas. La precisión intermedia y precisión instrumental se determinan realizando medidas repetidas (n=6) de la misma concentración de analito en días consecutivos y cada una de las medidas se prepararon de manera independiente. La variabilidad aportada por el día del ensayo no fue significativa, obteniéndose prácticamente el mismo coeficiente de variabilidad para la repetibilidad y la precisión intermedia, inferior al 0,5% para el caso de la valoración de pureza, e inferior al 3% para la determinación de sustancias relacionadas. Los parámetros que garantizan la idoneidad del sistema utilizado, en todos los casos han aportado valores que se encuentran dentro de los márgenes permitidos para ambos métodos.

Los resultados obtenidos sugieren que la **estabilidad** de la molécula de APL es superior a la estabilidad de la Amoxicilina sódica.

En la segunda parte del trabajo se abordó la seguridad de la molécula de APL en animales. Las pruebas de **toxicidad aguda** se realizaron como un estudio cualitativo y cuantitativo de los fenómenos tóxicos que pueden derivar de una administración única de la molécula de APL. Se evaluó la reacción de la piel en cada lugar de la inyección: presencia de eritema y edema.

El ensayo se dividió en dos partes: una **parte inicial** y una **parte confirmatoria**, donde se evaluó la reacción de la piel en cada lugar de inyección, a lo largo de los 30 minutos, 1, 2, 4 y 6 horas después de la administración, y diariamente durante un período de 14 días. A lo largo de este período de evaluación, los animales mostraron reacciones cutáneas que fueron clasificadas como leves de resolución espontánea; eritemas grado 1 y grado 2. No se produjeron cambios en el peso de los animales y su crecimiento no fue mermado, siendo su curva de peso la esperada para la especie y sexo de los animales. No se observaron cambios de comportamiento, ni modificaciones de conducta. Ni se registraron signos de toxicidad, muertes, ni alteraciones macroscópicas en órganos vitales.

De acuerdo con estos resultados la concentración máxima no irritante para la molécula de APL, estaba por encima de 20 mg/mL. Estos datos obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda, fueron útiles para el diseño de los estudios de **toxicidad subaguda** por administración repetida, realizado posteriormente. En este ensayo se realizaron dos pruebas, la primera en un **corto plazo** (4 semanas), y la segunda más a **largo plazo** (6 semanas). La administración de 0,5 mg/mL de la molécula de APL fue repetida intermitente (3 veces), administrando 30 µL/en 4 zonas diferentes.

En la evaluación de la seguridad, se observó que no hubo mortalidad, y ninguno de los animales mostró signos clínicos locales ni generales. Los animales no mostraron diferencias biológicamente significativas en el peso corporal, ni en la ingesta de alimentos. Del mismo modo, en la necropsia efectuada al final del período de estudio, no se observaron cambios de peso de los órganos, ni alteraciones en los órganos linfoides evaluados: bazo, timo, y ganglios linfáticos mesentéricos, axilares e inguinales. Las reacciones cutáneas locales se consideraron sin interés.

Se puede concluir, por tanto que la dosis de la molécula de APL ensayada en la toxicidad subaguda resultó ser no irritante.

En general, los individuos que son remitidos para ser evaluados como alérgicos o no a los antibióticos, se caracterizan porque tienen una historia clínica en muchas ocasiones inconsistente, y en ocasiones los intervalos de tiempo entre la ocurrencia de la reacción y el momento en que van a ser evaluados son excesivamente largos (García et al., 2012).

La alergia a medicamentos abarca un espectro de reacciones de hipersensibilidad, con mecanismos y presentaciones clínicas heterogéneas. Las reacciones de hipersensibilidad pueden ser severas, e incluso puede peligrar la vida, teniendo asociado un índice de mortalidad elevado, estos medicamentos representan el 8% de las admisiones hospitalarias y afectan al 20% de los pacientes hospitalizados. (Pawankar et al., 2013). Así por ejemplo, la alergia a β -lactámicos es “auto-referida” por lo menos en el 10% de los pacientes (Solensky, 2014), sin embargo menos del 24% de estos casos se pueden confirmar (Lee et al., 2000).

Aunque el diagnóstico de las reacciones alérgicas a medicamentos trata de identificar un mecanismo subyacente, requiere de conocimientos especiales y costosos, además de requerir mucho tiempo. Sin embargo, es crítico para hacer una gestión adecuada, y siéndolo también

para la prevención, y la prescripción de medicamentos alternativos, y en algunos casos para una posible desensibilización. Sin un diagnóstico eficaz, las reacciones alérgicas que se atribuyen a los β -lactámicos pueden ser causales, etiquetándose estos sujetos a menudo como alérgicos a β -lactámicos, cuando en realidad no lo son, por lo que se les prescriben antibióticos más caros o menos eficaces (Blanca et al., 1994; Didier et al., 1998; Bousquet et al., 2008).

Así un diagnóstico de alergia a β -lactámicos en los pacientes hospitalizados, ya sea confirmado o no. Es una desventaja del tratamiento, ya que aumenta el riesgo de resistencia bacteriana, aumenta el número de días ingresados en el hospital y de igual manera el riesgo de infecciones oportunistas, lo que repercute en el coste para el sistema de salud (Macy and Contreras et al., 2014; Satta et al., 2013).

La determinación de **liberación de histamina** se describió en el pasado siglo, sin embargo se ha alcanzado un uso limitado debido a que originariamente consumía mucho tiempo y sólo la sangre de unos pocos pacientes podía ser analizada al día, siendo además su sensibilidad para el diagnóstico de la alergia a medicamentos desconocida (Stahl-Skov et al., 1977).

Esta prueba se ha simplificado y su sensibilidad ha mejorado utilizando placas de microfibras de vidrio a la histamina que están unidas específicamente (Stahl-Skov et al., 1984); esto permite realizar las pruebas en cualquier laboratorio independiente con equipos disponibles. El sistema desarrollado presenta ventajas pues permite: a) realizar el estudio con sangre del paciente en una serie de concentraciones previamente diseñadas para la sustancia activa, b) testar hasta 10 sustancias activas en la misma placa, y c) la sangre heparinizada puede ser almacenada y transportada a temperatura ambiente hasta 36 horas antes de la prueba.

Para evaluar las reacciones inmediatas a β -lactámicos, principalmente Penicilinas, la técnica “in vitro” más ampliamente utilizada ha sido la técnica Inmunocap (Phadia, Uppsala) que permite la determinación de los niveles de IgE específica en suero. Esta técnica presenta una especificidad que se acerca al 90%, pero sin embargo los valores de sensibilidad se mantienen alrededor del 50% (Blanca et al., 2001; Sanz et al., 2002). Así, la baja sensibilidad de los métodos diagnósticos “in vitro” disponibles hoy en día, es uno de los grandes problemas que se plantean a la hora de llevar a cabo este tipo de técnicas en los pacientes con alergia a β -lactámicos.

La tercera parte del trabajo de investigación, surge al considerar que la sensibilidad de los métodos diagnóstico “in vitro” disponibles no es óptima, siendo especialmente baja en la técnica de Inmunocap (Mayorga et al., 2016; Blanca et al., 2001).

Se realizó una evaluación del **test de liberación de histamina** (TRH) con la molécula de APL, como representante de test “in vitro”. El estudio se llevó a cabo con la sangre de pacientes con reacciones de hipersensibilidad inmediata a la Amoxicilina en el último año, que presentaron pruebas cutáneas positivas y/o IgE específica para la Amoxicilina. Los resultados demostraron que en los basófilos de los 19 pacientes positivos estimulados con la molécula de APL, se produjo una liberación específica de histamina.

Nuestros resultados aportan datos que demuestran que tanto con la Amoxicilina sódica como con la molécula de APL, se obtiene un diagnóstico discriminante entre los pacientes sensibilizados y los controles. La alta correlación entre los resultados de liberación de histamina obtenidos utilizando ambas sustancias permiten asegurar la especificidad de la molécula APL y su homología con la Amoxicilina, antigénicamente hablando, lo que la convierte en una buena opción para ser usada en esta técnica de diagnóstico “in vitro”.

Con ambas moléculas se obtienen niveles de histamina liberada superiores para los pacientes frente a los controles, obteniéndose en el caso de la Amoxicilina una mediana de 16,5 ng para los pacientes frente a los 12 ng de histamina liberada obtenida en los controles, y 19,5 ng para los pacientes frente a 8 ng obtenidos en los controles en el uso de la molécula de APL. No obstante, los resultados de la molécula de APL muestran una diferencia superior respecto a los resultados de la Amoxicilina, 11,5 ng frente a 4,5 ng respectivamente, permitiendo una mejor discriminación de los pacientes y controles, y obteniéndose, además, una mayor sensibilidad en el diagnóstico con una menor concentración de analito.

Según Park et al., la sensibilidad del test de diagnóstico depende de la molécula que transporta (Park et al., 1987), siendo la sensibilidad para la molécula de APL de un 78,95%, en la evaluación del test de liberación de histamina (TRH). El análisis de las curvas ROC comparó los resultados obtenidos en el ensayo de liberación de histamina pasiva de la Amoxicilina sódica y la molécula de APL, en pacientes alérgicos versus pacientes no alérgicos. Determinando que la sustancia activa APL ofrece una mayor sensibilidad, 78,95% frente al 63,16%, que ofrece la Amoxicilina sódica en la misma prueba diagnóstica, y frente al 50% máximo de sensibilidad que permite obtener la determinación de niveles de IgE específica en suero por medio de la técnica “Inmunocap” (Phadia, Uppsala).

Si analizamos el ensayo llevado a cabo para el diagnóstico “in vitro” desde un punto de vista de especificidad, los resultados también son favorables: el valor de especificidad obtenido es de 100% para la molécula de APL, frente a un valor del 90% que se obtiene con la Amoxicilina sódica en el mismo ensayo.

Una de las ventajas del test de liberación de histamina pasiva frente al test de liberación directo, u otras técnicas diagnósticas como la estimulación de basófilo, es que las células del donante se seleccionan sobre la base de una alta capacidad de respuesta de IgE y suficiente contenido de histamina por basófilos.

Aunque uno de los principales retos de la utilización del test de liberación de histamina pasiva, sea tener acceso a un donante con basófilos que responda. Es el uso de un solo donante, lo que permite una reducción significativa en la variabilidad inter-individual debido a la capacidad de liberación de basófilos. Sin embargo, los resultados falsos negativos pueden ocurrir si el nivel de IgE específica en los sueros es bajo (Kleine et al., 2001).

A pesar de que estos resultados deben ser reproducidos en un mayor número de pacientes, este estudio abre un camino para la utilidad de la Amoxicilina octa L-Lisina en los test de liberación

de histamina. Hemos encontrado una buena correlación entre los resultados positivos para la molécula de APL y la Amoxicilina sódica. Los resultados ponen de manifiesto que la molécula de APL es un buen reactivo para el diagnóstico “in vitro” en pacientes con reacciones de hipersensibilidad a la Amoxicilina sódica, especialmente si tenemos en cuenta los resultados positivos obtenidos en 2 casos con pruebas de “skin prick test” negativas a la Amoxicilina sódica (Pacientes 10 y 11), además de los resultados positivos obtenidos en 3 casos, donde las pruebas de “skin prick test” no se habían realizado debido a la severidad de las reacciones, atendiendo a pacientes de alto riesgo (Pacientes 1,5 y 9).

Así, el uso de la molécula de APL en el test de liberación de histamina, se manifiesta como un método prometedor “in vitro”, abriéndose un ábanico inmenso de pacientes que podrían someterse a este tipo de diagnósticos como son pacientes con reacciones inmediatas a la Amoxicilina sódica, incluyendo aquellos pacientes en los que las pruebas cutáneas ó provocaciones no se pueden realizar debido al riesgo de reacciones sistémicas, y pacientes los cuales obtienen resultados negativos con las pruebas de “skin prick test”, pero resultados positivos con pruebas de provocación.

Si bien la determinación específica para IgE en β -lactamas es posible realizarla frente Penicilina G, Penicilina V, Ampicilina y Amoxicilina, su valor predictivo no es muy alto, por lo tanto esta prueba se debe realizar en combinación con “skin prick test” o pruebas de provocación, si se quiere obtener un diagnóstico preciso (Decuyper et al., 2016).

Por otra parte, y de acuerdo al protocolo definido por el grupo de trabajo de referencia “European Network of drug Allergy” (ENDA) de la “European Academy of Allergy and Clinical Immunology” EAACI (Romano et al., 2004; Blanca et al., 2009), el diagnóstico de la alergia a β -lactámicos se debe basar en la historia clínica del paciente, las pruebas cutáneas “in vivo” (“skin prick test” e intradérmicas), test “in vitro” (determinación de IgE, IgG u otros), y la realización de pruebas de provocación.

Por último, el Congreso Internacional sobre alergia a medicamentos en 2014 (Demoly et al., 2014), puso de relieve la necesidad de las pruebas biológicas discriminantes para establecer la naturaleza de los agentes causantes, en particular para pacientes que reciben varios medicamentos simultáneamente, y para aquellos pacientes potencialmente en riesgo cuando las pruebas cutáneas son negativas o no son posibles, y las pruebas de provocación están contraindicadas.

Todos estos antecedentes sirven de justificación a la última parte de este trabajo de investigación. La realización de un **ensayo clínico** para estimar la concentración de la molécula de APL que es capaz de producir un resultado positivo en pruebas cutáneas “in vivo”: “skin prick test” e intradérmicas.

En la práctica clínica, las pruebas cutáneas diagnósticas con Amoxicilina se realizan a la concentración óptima de 20 mg/mL (“skin prick test” y vía intradérmica) (Brockow et al., 2013). El número de pacientes incluidos en el estudio fue de 15, todos ellos eran alérgicos a aminopenicilinas. 11 pacientes (73,3%) presentaban valores de IgE específica de $1,91 \pm 4,61$ kU/I

y resultados positivos en las pruebas de “skin prick test” realizadas con Amoxicilina a 20 mg/mL. Los otros 4 casos, 3 de ellos tenían resultados negativos (21,4%) para las pruebas de “skin prick test”, sin embargo presentaban valores de IgE específica elevados $3,84 \pm 2,87$ kU/I. Y el último paciente a pesar de no ser sometido a la prueba de “skin prick test”, presentaba un valor de IgE específica muy elevada 9,61 KU/I. Todos ellos tenían una historia clínica compatible con reacciones de hipersensibilidad a Amoxicilina sódica.

Las pruebas cutáneas, según el algoritmo de diagnóstico a medicamentos del grupo ENDA, comenzaron con la realización de “skin prick test” con la molécula de APL a concentraciones crecientes, que fueron desde los 0,01 a los 0,5 mg/mL. El resultado de estas pruebas en todos los pacientes ensayados fue negativo. Aunque en el algoritmo anteriormente mencionado se asumen las pruebas “skin prick test” como menos sensibles y con un alto % de falsos negativos, a la vista de los resultados convendría evaluar en futuros ensayos concentraciones de la molécula de APL superiores a los 0,5 mg/ml para encontrar un mayor valor diagnóstico.

En cuanto a la vía intradérmica los resultados obtenidos fueron sensiblemente más favorables. Si bien los resultados de sensibilidad para el rango de concentraciones 0,01, 0,05, 0,1 mg/mL fueron inferiores al 34%. La concentración más elevada ensayada presentó un valor diagnóstico aceptable, con un valor de sensibilidad del 93%.

En este punto resulta importante añadir, que los resultados están de acuerdo con los algoritmos descritos para la detección de alergia a medicamentos, donde las concentraciones de mayor sensibilidad diagnóstica son las correspondientes a la vía intradérmica.

De manera adicional, los resultados obtenidos de IgE específica para esta concentración presentan, además, mayor correlación “in vitro” “in vivo”.

La concentración de APL de 0,5 mg/mL vía intradérmica, proporcionó 14 resultados positivos (93,33%) en pacientes con IgE específica de $3,10 \pm 4,62$ kU/I y 1 resultado negativo (6,67%) en un paciente con IgE específica 0,02 kU/I. Dado que el paciente con resultado negativo a la dosis ensayada, se corresponde con el paciente cuyo valor de IgE es el más bajo de la relación de pacientes seleccionados, cabe la posibilidad que sus reacciones frente al antibiótico no sean IgE mediada, considerándole así un paciente no apto para este tipo de diagnósticos.

Este aceptable dato de sensibilidad, permite pensar que esta molécula puede ser una alternativa en el diagnóstico por vía intradérmica en pacientes sensibilizados a la Amoxicilina sódica.

En cuanto a la dermatografía, la incidencia de reacciones cutáneas a fármacos es un 35% más elevada en las mujeres (Pichichero and Pichichero, 1998). En el ensayo clínico realizado en este trabajo, de los pacientes que han presentado alguna manifestación cutánea (n=12), 8 eran mujeres (66,7%) y 4 hombres (33,3%), valores estadísticos que concuerdan con lo descrito en la bibliografía. En relación al tiempo transcurrido entre la sospecha de reacción a β -lactámicos y la realización de pruebas cutáneas, Finke et al., (Finke et al., 1965) encontraron que dicho tiempo era una variable importante en el porcentaje de casos positivos.

Años más tarde, esta asociación tiempo-dependiente en el ratio de pruebas cutáneas positivas, tanto en adultos como en niños no fue observado por otros investigadores como Mendelson et al., (Mendelson et al., 1984). La información aportada por el ensayo clínico realizado en este trabajo, confirma a Mendelson et al., ya que el intervalo de la realización de las pruebas desde el episodio (1,5 meses-29 meses) no disminuye la reactividad positiva de las pruebas cutáneas realizadas con la molécula de APL.

Por último, y en relación al perfil de seguridad de la molécula descrita en este trabajo, cabe destacar que no se observó ninguna reacción adversa con ninguna de las concentraciones, ni con ninguna técnica diagnóstica empleada.

Aunque ninguna de las concentraciones muestran resultados determinantes, los resultados de este trabajo constituyen una aproximación a la obtención de una dosis de la molécula de APL eficaz en la confirmación del diagnóstico “in vivo” de la alergia a Amoxicilina, con el objetivo de seleccionar la terapia más eficaz y segura para los pacientes, a la vez que optimizar los recursos disponibles.

Finalmente y como resumen a todos los resultados contenidos en este trabajo, se puede concluir que la hapténización de la molécula de la Amoxicilina sódica con octa L-Lisina dando como resultado la molécula de APL permite: a) la obtención de una sustancia de mayor estabilidad que la Amoxicilina sódica, b) esta molécula ha demostrado ser válida para el desarrollo de un test cutáneo de mayor valor predictivo en la confirmación de casos de hipersensibilidad inmediata a derivados de la Amoxicilina sódica, c) disponer de un reactivo con utilidad en el diagnóstico “in vitro”, con especial interés en aquellos pacientes donde el diagnóstico “in vivo” puede suponer un riesgo.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis Doctoral “Desarrollo farmacéutico de una formulación de Amoxiciloil octa L-lisina, en el diagnóstico de la hipersensibilidad inmediata al antibiótico β -lactámico: Amoxicilina”, se ha llevado a cabo con el objetivo de desarrollar la molécula y estudiar la capacidad diagnóstica de la molécula de APL tanto “in vitro” como “in vivo”, en pacientes con reacciones alérgicas a la Amoxicilina, y su posible aplicación en los algoritmos de diagnóstico de la alergia a β -lactámicos.

En una primera etapa, se ha caracterizado la molécula de APL obtenida con diferentes técnicas analíticas, cromatográficas, RMN, e IR, entre otras, comprobándose además, la estabilidad de la misma. En una segunda fase, se abordó el estudio del perfil de seguridad de la molécula, mediante los parámetros de toxicidad aguda y subaguda. El último bloque del trabajo de investigación lo constituye el estudio de la sensibilidad y eficacia “in vitro” a través de los resultados en basófilos; test de liberación de histamina (TRH), así como el estudio de los datos de seguridad y eficacia obtenidos en un ensayo clínico, con una población de 15 pacientes alérgicos a la Amoxicilina.

En base a los resultados obtenidos en el desarrollo experimental, se presentan las siguientes conclusiones:

- 1) Se ha desarrollado y caracterizado un derivado hapténico denominado Amoxiciloil octa L-lisina (APL), molécula fruto de la unión de 8 cadenas de lisina, unidas cada una de ellas a un resto amoxiciloico.
- 2) Los valores obtenidos en la valoración de sustancia activa y sustancias relacionadas para la molécula de APL, demuestran que es estable a lo largo de los diferentes intervalos ensayados: 3,6,9 y 12 meses, en condiciones de 5°C y de 25°C y 60% HR. Se trata de una molécula con una inferior avidez por el agua, lo que le confiere mayor estabilidad frente Amoxicilina sódica. Los ensayos permiten concluir que APL sometido a degradaciones extremas es más estable que la Amoxicilina sódica.
- 3) El ensayo de toxicidad aguda determina que la concentración máxima no irritante (CMNI) de la molécula de APL es superior a 20 mg/mL. Durante la evaluación de la toxicidad aguda, no se observó en los animales mortalidad, ni signos clínicos como cambios en la piel, ojos, mucosas, alteraciones en la respiración y en el comportamiento, ni movimientos anormales. Mostraron una curva de peso corporal normal, no encontrándose anomalías en la necropsia, ni en la evaluación macroscópica “post mortem” de los órganos y tejidos.
- 4) Durante la evaluación de la toxicidad subaguda, no se apreciaron en los animales signos clínicos sistémicos de toxicidad, ni mortalidad. Tampoco se observaron reacciones cutáneas locales, ni diferencias biológicamente significativas en el peso corporal durante la necropsia. Las pruebas permiten concluir que la concentración de 0,5 mg/mL para la molécula de APL no es irritante, conforme a los criterios establecidos en la clasificación interna establecida en base a la OECD N°16 “Series on testing and assessment”.
- 5) Para la técnica de liberación de histamina, la molécula de APL ofrece una elevada sensibilidad (78,95%) y mayor especificidad (100%) que la Amoxicilina sódica. Es una molécula que puede

Conclusiones

ser utilizada para mejorar la precisión diagnóstica “in vitro” de las reacciones alérgicas. Su utilización permite un diagnóstico más fiable y concluyente que utilizando la Amoxicilina sódica, para la técnica de liberación de histamina.

6) En la realización del ensayo clínico, ninguno de los pacientes del grupo control con la molécula de APL, reaccionó de forma positiva a las concentraciones ensayadas para “skin prick test”. Podemos concluir, por tanto, que las concentraciones para el desarrollo de dicho test cutáneo deben ser mayores a 0,5 mg/mL.

7) La prueba de intradermo test, realizada en el ensayo clínico con la molécula de APL a la concentración de 0,5 mg/mL, presenta resultados de sensibilidad del 93,3%. La aplicación de esta técnica de diagnóstico no originó ninguna reacción adversa. Este aceptable dato de sensibilidad, permite pensar que esta molécula puede ser una alternativa en el diagnóstico por vía intradérmica en pacientes sensibilizados a Amoxicilina sódica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. 8ª edición. Elsevier España; 2015.
- Abbas A, Williams ME, Burstein HJ, Chang TL, Bossu P, Lichtman AH. Activation and Functions of CD4+ T cell Subsets. *Immunol Rev*. 1991; 123:5-22.
- Abraham SN, Arock M. Mast cells and basophils in innate immunity. *Semin Immunol*. 1998; 10(5):373-381.
- Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, Gaonar H, Antegarden JE, Leynadier F, Girot R. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(6):921-928.
- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(1):18-27; quiz 28-9.
- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance of allergens. *World Allergy Organ J*. 2015; 14:8(1):17.
- Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011; 3(1):11-20.
- Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33(10):692-699.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infections. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(12):975-987.
- Antibiotic resistance threats in the United States. Centers for Diseases Control and Prevention. 2013 (consultado 2016). <http://www.cdc.gov/drugresistance/threatreport-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- Antúñez C, Fernandez T, Blanca-López N, Torres MJ, Mayorga C, Canto G, Fernández J, Moya MC, Blanca M. IgE antibodies to betalactams: relationship between the triggering hapten and the specificity of the immune response. *Allergy*. 2006; 61(8):940-946.
- Antúñez C, Martín E, Cornejo-García JA, Blanca-Lopez N, R-Pena R, Mayorga C, Torres MJ, Blanca M. Immediate hypersensitivity reactions to penicillins and other betalactams. *Curr Pharm Des*. 2006; 12(26):3327-3333.
- Apter AJ, Kinman JL, Bilker WB, Herlim M, Margolis DJ, Lautenbach E, Hennessy S, Strom BL. Is there cross-reactivity between penicillins and cephalosporins?. *Am J Med*. 2006; 119(4):354.e11-19.
- Ariza A, Mayorga C, Salas M, Doña I, Martín-Serrano A, Pérez-Inestrosa E, Pérez- Sala D, Guzmán AE, Montañez MI, Torres MJ. The influence of the carrier molecule on amoxicillin recognition by specific IgE in patients with immediate hypersensitivity reactions to betalactams. *Sci Rep*. 2016; 6:35113.
- Ariza A, Garzon D, Abánades DR, de los Ríos V, Vistoli G, Torres MJ, Carini M, Aldini G, Pérez-Salas D. Protein haptentation by amoxicillin: High resolution mass spectrometry analysis and identification of target proteins in serum. *J Proteomics*. 2012; 77:504-520.

- Ariza A, Collado D, Vida Y, Montañez MI, Pérez-Inestrosa E, Blanca M, Torres MJ, Cañada FJ, Pérez-Sala D. Study of protein haptentation by amoxicillin through the use of a biotinylated antibiotic. *PLoS one*. 2014; 9(3):e90891.
- Ariza A, Mayorga C, Fernandez TD, Barbero N, Martín-Serrano A, Pérez-Sala D, Sánchez-Gómez FJ, Blanca M, Torres MJ, Montañez MI. Hypersensitivity reactions to beta-lactams: relevance of hapten-protein conjugates. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015; 25(1):12-25.
- Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th Century. *JAMA*. 1999; 281(1):61-66.
- Audicana M, Bernaola G, Urrutia I, Echechipia S, Gastaminza G, Muñoz D, Fernández E, Fernández de Corres L. Allergic reactions to betalactams: studies in a group of patients allergic to penicillin and evaluation of cross-reactivity with cephalosporin. *Allergy*. 1994; 49(2):108-113.
- Baird B, Sheets ED, Holowka D. How Does the Plasma Membrane Participate in Cellular Signaling by Receptors for Immunoglobulin E?. *Biophys Chem*. 1999; 82:109-119.
- Barberan J, Mensa J, Fariñas C, Llinares P, Olaechea P, Palomar M, Torres MJ, Moreno E, Serrano R, García JA. Recomendaciones de tratamiento antimicrobiano en pacientes alérgicos a antibióticos β -lactámicos. *Rev Esp Quimioter*. 2008; 21(1):60-82.
- Barnett ML, Linder JA. Antibiotic prescribing for adults with acute bronchitis in the United States, 1996-2010. *JAMA*. 2014; 311(19):2020-2022.
- Bergmann KC, Ring J. History of Allergy. Vol 100. Switzerland. Ed Karger; 2014.
- Bhattacharyya PK, Cort WM. Amoxycillin. En: Florey K (Eds) *Analytical Profiles of Drug Substances*. Ed Elsevier. New York and London. 1978 (7): 19-41.
- Blackley CH. Experimental researches on the causes and natura of catarrhus aestivus. London. Ed Bailieri Tindal & Findak Cox; 1873.
- Blanca M, Vega JM, Garcia J, Carmona MJ, Terrados S, Avila MJ, Miranda A, Juárez C. Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins; study of the incidence in subjects allergic to beta-lactams. *Clin Exp Allergy*. 1990; 20(5):475-481.
- Blanca M, Vega JM, Garcia J, Miranda A, Carmona MJ, Juárez C, Terrados S, Fernández J. New aspects of allergic reactions to betalactams: crossreactions and unique specificities. *Clin Exp Allergy*. 1994; 24(5):407-415.
- Blanca M, Mayorga C, Torres MJ, Reche M, Moya MC, Rodríguez JL, Romano A, Juárez C. Clinical evaluation of Pharmacia CAP System RAST FEIA amoxicilloyl and benzylpenicilloyl in patients with penicillin allergy. *Allergy*. 2001; 56(9):862-870.
- Blanca M, Mayorga C, Torres MJ, Warrington R, Romano A, Demoly P, Silvin-Dan F, Moya M, Fernández J, Juárez C. Side-chain-specific reactions to betalactams: 14 years later. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32(2):192-197.
- Blanca M, Romano A, Torres MJ, Fernández J, Mayorga C, Rodríguez J, Demoly P, Bousquet PJ, Merk HF, Sanz ML, Ott H, Atanaskovic-Markovic M. Update on the evaluation of hypersensitivity reactions to β -lactams. *Allergy*. 2009; 64(2):183-193.

- Blanca-Lopez N, Perez-Alzate D, Ruano F, Garcimartin M, de la Torre V, Mayorga C, Somoza ML, Perkins J, Blanca M, Canto MG, Torres MJ. Selective immediate responders to amoxicillin and clavulanic acid tolerate penicillin derivative administration after confirming the diagnosis. *Allergy*. 2015; 70(8):1013–1019.
- Bostock J. Of the Catarrhus aestivus, or Summer Catarrh. *Med Chir Trans*. 1828; 14(Pt 2):437-446.
- Bousquet PJ, Pipet A, Bousquet-Rouanet L, Demoly P. Oral challenges are needed in the diagnosis of β -lactam hypersensitivity. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(1):185–190.
- Bousquet PJ, Co-Minh HB, Arnoux B, Daures JP, Demoly P. Importance of mixture of minor determinants and benzylpenicilloyl poly-L-lysine skin testing in the diagnosis of beta-lactam allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115(6):1314-1316.
- Brockow K, Garvey LH, Aberer W, Atanaskovic-Markovic M, Barbaud A, Bilo MB, Bircher A, Blanca M, Bonadonna B, Campi P, Castro E, Cernadas JR, Chiriac AM, Demoly P, Grosber M, Gooi J, Lombardo C, Mertes PM, Mosbech H, Nasser S, Pagani M, Ring J, Romano A, Scherer K, Schnyder B, Testi S, Torres M, Trautmann A, Terreehorst I. Skin test concentrations for systemically administered drugs – an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. *Allergy*. 2013; 68(6):702-712.
- Brockow K, Przybilla B, Aberer W, Bircher AJ, Brehler R, Dickel H, Fuchs T, Jakob T, Lange L, Pfützner W, Mockenhaupt M, Ott H, Pfaar O, Ring J, Sachs B, Sitter H, Trautmann A, Trendler R, Wedi B, Worm M, Wurpts G, Zuberbier T, Merk HF. Guidelance for the diagnosis of drug hypersensitivity reactions. *Allergo J Int*. 2015; 24(3):94-105.
- Brown AG. Beta-Lactam nomenclature. *J Antimicrob Chemother*. 1982; 10(5):365-368.
- Budavari S. The Merck Index. 12th ed. United States. Merck and Co Inc. White house Station; 1996.
- Campos J, Baquero F. Resistencia a antibióticos. ¿Qué hacer ahora?. *Med Clin*. 2002; 119:656-658.
- Cardona V, Cabañes N, Fernández MM, Freijó C, Guardia P, De la Hoz B, Lobera T, Nevot S, Pascual C, Vega A, Villarroel P, Chivato T. Guideline for the management of anaphylaxis. *Med Clin*. 2011; 136(8):349-355.
- Cars O, Mölstad S, Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet*. 2001; 357(9271):1851-1853.
- Constant SL, Lee KS, Bottomly K. Site of antigen delivery can influence T cell priming: pulmonary environment promotes preferential Th2-type differentiation. *Eur J Immunol*. 2000; 30(3):840-847.
- Costa JJ, Weller PF, Galli SJ. The cells of the allergic response: mast cells, basophils, and eosinophils. *JAMA*. 1997; 278(22):1815-1822.
- Decuyper II, Ebo DG, Uyttebroek AP, Hagendorens MM, Faber MA, Bridts CH, De Clerck LS, Sabato V. Quantification of specific IgE antibodies in immediate drug hypersensitivity: More shortcomings than potentials?. *Clin Chim Acta*. 2016; 460:184-189.

- De Haan P, De Jonge AJ, Verbrudge T, Boorsma DM. Three epitope-specific monoclonal antibodies against the hapten penicillin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1985; 76(1):42- 46.
- Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, Huskins WC, Paterson DL, Fishman NO, Carpenter CF, Brennan PJ, Billeter M, Hooton TM, Infectious Diseases Society of America, Society for Healthcare Epidemiology of America. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis*. 2007; 44(2):159-177.
- Demoly P, Adkinson NF, Brockow K, Castells M, Chiriac AM, Greenberger PA, Khan DA, Lang DM, Park HS, Pichler W, Sánchez-Borges M, Shiohara T, Thong BY. International Consensus on drug allergy. *Allergy*. 2014; 69(4):420–437.
- Demoly P, Lebel B, Messaad D, Sahla H, Rongier M, Daurés JP, Godard P, Bousquet J. Predictive capacity of histamine release for the diagnosis of drug allergy. *Allergy*. 1999; 54(5):500-506.
- De Weck AL, Sanz ML. Cellular Allergen Stimulation Test (CAST) 2003, a review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2004; 14: 253-273.
- Didier G, Maison P, Carbon C, Balkan B, Vanzalle-Kervroëdan F, Sermet C, Bouvenot G, Eschwege E. Trends in antimicrobial drug use in the community- France, 1981-1992. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998; 177(2):492-497.
- Doña I, Blanca-López N, Torres MJ, García-Campos J, García-Núñez I, Gómez F, Salas M, Rondón C, Canto MG, Blanca M. Drug hypersensitivity reactions: response patterns, drug involved, and temporal variations in a large series of patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012; 22(5):363–371.
- Ebruster H. The prick test, a recent cutaneous test for the diagnosis of allergic disorders. *Wien Klin Wochenschr*. 1959; 71:551-554.
- Edgar N, Ralf M. Structure Elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with Ion Trap MSn and accurate Mass Determination by ESI TOF. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2005; 16:1670-1676.
- European Centre for Disease Control/European Medicines Agency. ECDC/EMA Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. (Consultado 2016). Doc. ref. EMA/576176/2009.3.https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. 2013. (Consultado 2016). <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>.
- European Pharmacopoeia 8.0 Amoxicillin Sodium. 01/2013:0260.
- European Pharmacopoeia 8.7 Método 5.4 disolventes residuales. 01/2016.

- Fernández J, Torres MJ, Campos J, Arribas F, Blanca M, DAP-Diater Group. Prospective, multicenter clinical trial to validate new products for skin tests in the diagnosis of allergy to penicillin. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013; 23(6):398-408.
- Fescina RH, Simini F, Belitzky R. Evaluación de los procedimientos diagnósticos. Aspectos metodológicos. *Salud Perinatal PP*. 1985; 2:39-43.
- Finke SR, Grieco MH, Connell JT, Smith EC, Sherman WB. Results of comparative skin tests with penicilloyl-polylysine and penicillin in patients with penicillin allergy. *Am J Med*. 1965; 38:71-82.
- Flöistrup H, Swart J, Bergström A, Alm JS, Scheynius A, Van Hage M, Waser M, Braun-Fahrlander C, Schram-Bijkerk D, Huber M, Zutavern A, Von Mutius E, Ublagger E, Riedler J, Michaels KB, Pershagen G, Parsifal Study Group. Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(1):59-66.
- Fontaine C, Mayorga C, Bousquet PJ, Arnoux B, Torres MJ, Blanca M, Demoly P. Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate β -lactam allergy. *Allergy*. 2007; 62(1):47-52.
- Frinkelman FD, Rothenberg ME, Brandt EB, Morris SC, Strait RT. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115(3):449-457.
- Gaeta F, Valluzzi RL, Alonzi C, Maggioletti M, Caruso C, Romano A. Tolerability of aztreonam and carbapenems in patients with IgE-mediated hypersensitivity to penicillins. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135(4):972-976.
- García I, Barasona MJ, Algaba MA, Moreno C, Guerra F. Diagnosis of patients with immediate hypersensitivity to β -lactams using retest. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012; 22(1):41-47.
- Gell PG, Coombs RR. Clinical Aspects of Immunology. 1th Ed. Oxford, Blackwell; 1963.
- Guengerich FP. Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2011; 26(1):3-14.
- Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products. WHO. Technical report series. No.850, 1995, annex 3.
- Guideline on clinical evaluation of diagnostic agents. CPMP/EWP/1119/987/Rev 1.
- Harris LH, Shure N. Sudden death due to allergy tests. *J Allergy*. 1950; 21(3):208-216.
- Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:193-204.
- Hirsch JG, Hirsch BI. Paul Ehrlich and the discovery of the eosinophil; in Mahmoud AAF, Austen KF. The Eosinophil in Health and Disease. New York. Ed Grune & Stratton; 1980, pp 3-23.
- Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:218-230.
- Holgate ST, Church MK, Broide DH, Martinez F. Allergy. 4th. UK/USA. Ed Elsevier Saunders. 2012.

- [http:// epidemiologiamolecular.com/inmunoglobulinas/](http://epidemiologiamolecular.com/inmunoglobulinas/). (Consultado 2016).
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inmunoglobulinas-tipos.png>. (Consultado 2016).
- <http://uhaweb.hartford.edu/BUGL/immune.htm>. (Consultado 2016).
- <http://www.phadia.com/en/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Lab-Tests/sIgE/Test-Principle>. (Consultado 2016).
- <http://www.aemps.gob.es>. (Consultado 2017).
- <http://www.msssi.es>. (Consultado 2017).
- Huang JF, Thurmond RL. The new biology of histamine receptors. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008; 8:21-27.
- ICH Topic Q2 (R1). Validation of analytical procedures: Text and methodology. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPHP/ ICH/381/95).
- ICH Topic Q1A (R2). Note for guidelance on Stability Testing; Stability Testing of New Drug substance and Products. (CPMP/ICH/2736/99).
- Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwart LB. Two subtypes of human mast cells that have distinc neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:4464-4468.
- Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*. 1967; 99(6):1187-1198.
- Johaness CB, Ziyadeh N, Seeger JD, Tucker E, Reiter C, Faich G. Incidence of allergic reactions associated with antibacterial use in a large, managed care organization. *Drug Saf*. 2007; 30(8):705-713.
- Johansson SGO, Mellbin T, Wahlquist B. Immunoglobulin levels in Ethiopian Pre-school Children with Special Reference to High Concentration of Immunoglobulin E (AND). *Lancet*. 1968; 1:1118.
- Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*. 2008; 9(11): 1215-1223.
- Kanny G, Beaudouin E, Demoly P, Guenard L, Ponvert C, Grand JL, Gallen C, Chalmet P, Croizier A, Jacquier JP, Morisset M, Auffret A, Cordebar V, Debavelaere C, Devoisius JM, Nootens C, Petit N, Pirson F, Sorlin A, Anchier A, Bossé I, Buard M, Chappard C, Cocheanu F, Delauney S, Delepouille F, Dubegny B, El Guedarri Y, Fardeaux MF, Gayraud J, Hallet JL, Lesellin J, Donguy FL, Mallet JP, Masson H, Paquin ML, Rame JM, Sullerot I, Moueret-Vantrín DA. Severe drug allergy: the first 100 cases declared to allergy vigilance network. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115 (Suppl. S): S183.
- Kay AB, Bousquet J, Holt PG, Kaplan AP. Allergy and Allergic Diseases. 2nd edition. Vol 1. Oxford. Ed Wiley-Blackwell; 2008.
- Khan DA, Solensky R. Drug Allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2 Suppl 2):S126-137.
- Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Ann Rev Immunol*. 1999; 17: 931-972.

- Kleine Budde I, de Heer PG, Van der Zee JS, Aalberse RC. The stripped basophil histamine release bioassay as a tool for the detection of allergen-specific IgE in serum. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001; 126: 277–285.
- Koeberlein A, Huesgen AG. Analysis of amoxicillin and five impurities on the Agilent 1220 Infinity LC System. Agilent Technologies. 2010; 5990-6093EN.
- Kobayashi H, Ishizuka T, Okayama Y. Human mast cells and basophils are sources of cytokines. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30(9):1205-1212.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic Pathology. 8th edition. Philadelphia. Ed Saunders Elsevier; 2007.
- Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J Exp Med*. 1935; 61(5):643-656.
- Larsh JE Jr. Allergic inflammation as a hypothesis for the expulsion of worms from tissues: a review. *Exp Parasitol*. 1975; 37(2): 251-266.
- Lee CE, Zembower TR, Fotis MA, Postelnick MJ, Greenberger PA, Peterson LR, Noskin GA. The incidence of antimicrobial allergies in hospitalized patients: implications regarding prescribing patterns and emerging bacterial resistance. *Arch Intern Med*. 2000; 160(18):2819-2822.
- Llor C, Hernández S. Infectious disease in primary care: 1-year prospective study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28(4):222-226.
- Llor C. Can the use of antibiotics be improved in outpatients in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(7):409-411.
- López S, Blanca-López N, Cornejo-García JA, Canto G, Torres MJ, Mayorga C, Blanca M. Nonimmediate reactions to betalactams. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007; 7(4):310-316.
- Macy E, Contreras R. Health care use and serious infection prevalence associated with penicillin "allergy" in hospitalized patients: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133(3):790–796.
- Mayorga C, Obispo T, Jimeno L, Blanca M, Moscoso del Prado J, Carreira J, García JJ, Juárez C. Epitope mapping of beta-lactam antibiotics with the use of monoclonal antibodies. *Toxicology*. 1995; 97(1-3):225-234.
- Mayorga C, Celik G, Rouzaire P, Whitaker P, Bonadonna P, Rodrigues-Cernadas J, Vultaggio A, Brockow K, Caubet JC, Makowska J, Nakonechna A, Romano A, Montañez MI, Laguna JJ, Zanoni G, Gueant JL, Oude Elberink H, Fernández J, Viel S, Demoly P, Torres MJ, In Vitro test for Drug Allergy Task Force of EAACI Drug Interest Group.. In vitro tests for Drug Hypersensitivity Reactions. An ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group Position Paper. *Allergy*. 2016; 71(8):1103-1134.
- McFadden ER Jr, Gilbert IA. *Asthma*. *N Engl J Med*. 1992; 327(27):1928-1937.
- McNulty CA, Richards J, Livermore DM, Little P, Charlett A, Freeman E, Harvey I, Thomas M. Clinical relevance of laboratory-reported antibiotic resistance in acute uncomplicated urinary tract infection in primary care. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58(5):1000-1008.

- Mendelson LM, Ressler C, Rosen JP, Selcon JE. Routine elective penicillin allergy skin testing in children and adolescents: study of sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* Jan 1984; 73(1 Pt 1):76-81.
- Miranda A, Blanca M, Vega JM, Moreno F, Carmona MJ, Garcia JJ, Segurado E, Justicia JL, Juarez C. Cross-reactivity between a penicillin and a cephalosporin with the same side chain. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 98(3):671-677.
- Naisbitt DJ, Williams DP, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK. Reactive metabolites and their role in drug reactions. *Curr Opin Allergy Immunol.* 2001; 1(4):317-325.
- Neuhaus FC, Georgopapadakou N. Strategies in betalactam design. En: Sutcliffe JA, Georgopapadakou N. (Eds). *Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy.* Ed Chapman and Hall. Nueva York. 1992; 205-273.
- OECD (2013), *Health at a Glance 2013: OECD Indicators*, OECD Publishing.
http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2013-en. (Consultado 2017).
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Health Effects. Test N° 404: Acute Dermal Irritation/corrosion. 2002.
- OECD Series on Testing and Assessment Test N°16; Detailed Review Document on Classification Systems for Skin Irritation/Corrosion in OECD Member Countries. 1999.
- OECD Guidelines document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animal used in safety evaluation. (ENJ/JM/MONO (2000)7).
- Orr TS, Blair AM. Potentiated reagin response to egg albumin and conalbumin in *Nippostrongylus braziliensis* infected rats. *Life Sci.* 1969; 8(20):1073-1077. Palm NW, Rosenstein RK, Medzhitov R. Allergic host defences. *Nature.* 2012; 484(7395):465-472.
- Palop Larrea V, Melchor Penella A, Martínez Mir I. Reflections on the use of antibiotics in primary care. *Aten Primaria.* 2003; 32(1):42-47.
- Park BK, Tingle MD, Grabowski PS, Coleman JW, Kitteringham NR. Drug-protein conjugates-XI. Disposition and immunogenicity of dinitrofluorobenzene, a model compound for the investigation of drugs as haptens. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36(5):591-599.
- Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF, Blaiss MS. World Allergy Organization (WAO). *White book on Allergy.* Wisconsin, United States of America. 2013.
- Pérez JL, Canut M, Losa JE, Mateo JE, F, Muro A. Guía de autoformación en enfermedades infecciosas. Médica Panamericana, Madrid. 1996; 259-275.
- Peterson WL, Fendrick AM, Cave DR, Peura DA, Garabedian-Ruffalo SM, Laine L. *Helicobacter pylori-related* disease: guidelines for testing and treatment. *Arch Intern Med.* 2000; 160(9):1285-1291.
- Pichichero ME, Pichichero DM. Diagnosis of penicillin, amoxicillin, and cephalosporin allergy: reliability of examination assessed by skin testing and oral challenge. *J Pediatr.* 1998; 132(1): 137-143.
- Portier P, Richet C. De l'acción anaphylactique des certains venins. *CR Soc Biol.* 1902; 54:170.

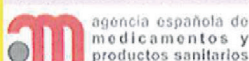
- Prausnitz C, Küstner H. Studien über die Überempfindlichkeit. Zentralbl Bakteriell Parasitenkol Infektionskt. 1921; 86:160-169.
- Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science*. 2012; 337(6093):431-435.
- Ring J. Allergy in Practice. Berlin. Ed Springer Science. 2005.
- Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott RD, Foster SD, Abbasi F, Schabowski S, Kampe LM, Ciavarella GG, Supino M, Naples J, Cordell R, Levy SB, Weinstein RA. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: Implications for antibiotic stewardship. *Clin Infect Dis*. 2009; 49:1175-1184.
- Romano A, Blanca M, Torres MJ, Bircher A, Aberer W, Brockow K, Pichler WJ, Demoly P, for ENDA and the EAACI interest group on drug hypersensitivity. Diagnosis of nonimmediate reactions to beta-lactam antibiotics. *Allergy*. 2004; 59:1153-1160.
- Romano A, Gaeta F, Arribas F, Valluzzi RL. Cross – Reactivity among Beta-Lactams. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016; 16-24.
- Romano A, Gaeta F, Valluzzi RL, Maggioletti M, Zaffiro A, Caruso C, Quarantino D. IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins: Cross-reactivity and tolerability of alternative cephalosporins. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136(3):685–691.
- Romano A, Guéant-Rodriguez RM, Viola M, Amoghly F, Gaeta F, Nicolas JP, Guéant JL. Diagnosing immediate reactions to cephalosporins. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35(9):1234-1242.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009; 39(8):2076-2082.
- Sanz ML, Gamboa PM, Antépara I, Vasuf C, Vila L, Garcia-Avilés C, Chazot M, De Weck AL. Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32(2):277-286.
- Sanz ML, Maselli JP, Gamboa PM, Oehling A, Diéguez I, De Weck AL. Flow cytometric basophil activation test: a review. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2002; 12(3):143-154.
- Satta G, Hill V, Lanzman M, Balakrishnan I. β -lactam allergy: clinical implications and costs. *Clin Mol Allergy*. 2013; 11(1):2.
- Saxon A, Beall GN, Rohr AS, Adelman DC. Immediate hypersensitivity reactions to betalactam antibiotics. *Ann Intern Med*. 1987; 107(2):204-215.
- Schrag SJ, Peña C, Fernández J, Sánchez J, Gómez V, Pérez E, Feris JM, Besser RE. Effect of short-course, high-dose amoxicillin therapy on resistant pneumococcal carriage: A randomized trial. *JAMA*. 2001; 286(1):49-56.
- Schloss OM. A case of allergy to common food. *Am J Dis Child*. 1912; 3:341-362.
- Shakoory B, Fitzgerald SM, Lee SA, Chi DS, Krishnaswamy G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. *J Interferon Cytokine Res*. 2004; 24(5):271- 281.
- Simons FE. Anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2 Suppl 2):S161-181.
- Solensky R. Penicillin allergy as a public health measure. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133(3):797-798.

- Stahl Skov P, Norn S, Weeke B. A new method for detecting histamine release. *Agents Actions*. 1984; 14(3-4):414-416.
- Stahl-Skov P, Norn S A simplified method for measuring basophil histamine release and blocking antibodies in hay fever patients. Basophil histamine content and cell preservation. *Acta Allergol*. 1977; 32(3):170-182.
- Steinke JW, Rich SS, Borish L. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121(2 Suppl):S384-387; quiz S416.
- Stevens RL, Adachi R. Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunol Rev*. 2007; 217:155-167.
- Taylor RS, Simpson IN. Review of treatment options for lyme borreliosis. *J Chemother*. 2005; 17(Suppl 2): 3-16.
- Torres MJ, Blanca M, Fernández J, Romano A, Weck A, Aberer W, Brockow K, Pichler WJ, Demoly P, for ENDA, and the EAACI Interest Group on Drug Hypersensitivity. Diagnosis of immediate allergic reactions to β -lactam antibiotics. *Allergy*. 2003; 58(10):961-972.
- Torres MJ, Blanca M. The complex clinical picture of beta-lactam hypersensitivity: penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems, and clavams. *Med Clin North Am*. 2010; 94(4):805-820.
- Torres MJ, Romano A, Mayorga C, Moya MC, Guzman AE, Reche M, Juarez C, Blanca M. Diagnostic evaluation of a large group of patients with immediate allergy to penicillins; the role of skin testing. *Allergy*. 2001; 56(9):850-856.
- Torres MJ, Montañez MI, Ariza A, Salas D, Fernández TD, Barbero N, Mayorga C, Blanca M. The role of IgE recognition in allergic reactions to amoxicillin and clavulanic acid. *Clin Exp Allergy*. 2016; 46(2):264-274.
- Torres MJ, Romano A, Celik G, Demoly P, Khan DA, Macy E, Park M, Blumenthal K, Aberer W, Castells M, Barbaud A, Mayorga C, Bonadonna P. Approach to the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: similarities and differences between Europe and North America. *Clin Transl Allergy*. 2017; 7:7.
- Torres MJ, Ariza A, Fernández J, Moreno E, Laguna JJ, Montañez MI, Ruiz-Sánchez AJ, Blanca M. Role of minor determinants of amoxicillin in the diagnosis of immediate allergic reactions to amoxicillin. *Allergy*. 2010; 65(5):590-596.
- Von Piquet C. Allergie. *Munich Med Wochenschr*. 1906; 53:1457.
- Von Pirquet C. Tuberkulose diagnose durch kutane Impfung. *Berlin Klin Wochenschr* 1907; 1907:644.
- Walker IC. Study III: Studies in the Sensitization of Patients with Bronchial Asthma to Bacterial Proteins as demonstrated by the Skin Reaction and the Methods employed in the Preparation of these Proteins. *J Med Res*. 1917; 35(3):487-495.

- Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB. Eosinophils: Biology and role in disease. *Adv Immunol.* 1995; 60:151-266.
- Weidner N, Austen KF. Mast cells: development, identification, and physiologic roles. *Lab Invest.* 1990; 63:63.
- Weiss ME, Adkinson NF. Immediate hypersensitivity reactions to penicillin and related antibiotics. *Clin Allergy.* 1988; 18:515-540.
- Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic diseases: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Rev Immunol.* 2001; 1(1):69-75.
- Wu LC, Zarrin AA. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14(4):247-259.
- Wyman M. Autumnal catarrh (hay fever). New York. Ed Hurd & Houghton; 1872.
- Yerushalmy J. Statistical problems in assessing methods of medical diagnosis, with special reference to X-ray techniques. *Public Health Rep.* 1947; 62(40):1432-1449.
- Zhao Z, Baldo BA, Baumgart KW. Fine structural recognition specificities of the Ig E antibodies distinguishing amoxicilloyl and amoxicillanyl determinants in allergic subjects. *J Mol Recognit.* 2001; 14:300-307.

ANEXOS

Anexo I: Resolución favorable del ensayo clínico N°EUDRACT 2013-000455-40 con medicamento con calificación de PEI (N° DE PEI 13-042)



DEPARTAMENTO
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO
Área de Ensayos Clínicos

DESTINATARIO

Tecnalia
Hospital Universitario Araba. Sede Txagorritxu.
UEC-Plat 4°C Jose Atxotegui s/n
01009 Vitoria (España)

REFERENCIA: MUH/AEC

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLÍNICO N° EUDRACT 2013-000455-40 CON MEDICAMENTO CON CALIFICACIÓN DE PEI (N° DE PEI13-042)

Adjunto se remite la resolución sobre el ensayo clínico titulado **Ensayo clínico prospectivo, unicéntrico, abierto, controlado con método de referencia (diagnóstico clínico)**, para la obtención de la dosis óptima y seguridad de Amoxicilolol Octa-L-Lisina (APL), para el diagnóstico de alergia a aminopenicilinas y antibióticos afines mediante pruebas cutáneas, N° EudraCT: 2013-000455-40.

El promotor o solicitante nombrado por éste deberá notificar la fecha de inicio del ensayo en España, remitir la información pertinente o solicitar autorización a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, según proceda y de acuerdo con lo que establece el Real Decreto 223/2004, de las modificaciones relevantes a la documentación del ensayo, informes de seguimiento, sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas, finalización del ensayo y demás circunstancias que establezca la legislación vigente.

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Localizador: Y4QKY264C3

Fecha de la firma: 04/07/2013

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO

smhaem@aemps.es

Página 1 de 4

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043



Referencia: MUH/CLIN

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLINICO Nº
EUDRACT 2013-000455-40

DESTINATARIO: Diater Laboratorio de Diagnóstico y Aplicaciones Terapéuticas, S.A.
Avda. Gregorio Peces Barba, nº2
28918 Leganés (España)

Vista la solicitud formulada por Tecnia para la realización del ensayo clínico número 2013-000455-40, titulado Ensayo clínico prospectivo, unicéntrico, abierto, controlado con método de referencia (diagnóstico clínico), para la obtención de la dosis óptima y seguridad de Amoxiciloil Octa-L-Lisina (APL), para el diagnóstico de alergia a aminopenicilinas y antibióticos afines mediante pruebas cutáneas, código de protocolo del promotor DIA-APL-01-13, cuyo promotor es Diater Laboratorio de Diagnóstico y Aplicaciones Terapéuticas, S.A. se emite resolución a tenor de los siguientes:

ANTECEDENTES DE HECHO

PRIMERO: Con fecha 25/03/2013, solicita la autorización de este ensayo clínico.

SEGUNDO: Con fecha 14/05/2013 se solicitaron aclaraciones que fueron adecuadamente respondidas.

TERCERO: A la solicitud de ensayo se acompaña solicitud de calificación del medicamento Amoxiciloil Octa-L-Lisina, como producto en fase de investigación clínica.

A estos antecedentes de hecho les es de aplicación los siguientes:

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Único.- Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero; la Ley 12/2000, de 29 de diciembre de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Ley 29/2006, de 26 de julio, de Garantías y Uso Racional de Medicamentos y Productos Sanitarios; el Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Localizador: Y4QKY284C3

Fecha de la firma: 04/07/2013

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO
smhaem@aemps.es

Página 2 de 4

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 916225073
Fax: 916225043



LA DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

D^a. Belén Crespo Sánchez-Eznarraga

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Localizador: Y4QKY264C3

Fecha de la firma: 04/07/2013

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

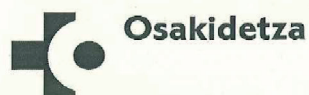
CORREO ELECTRÓNICO

smhaem@aemps.es

Página 4 de 4

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043

Anexo II; Comité Éticode Investigación Clínica del Hospital Universitario de Araba.



CEIC Hospital Universitario Araba

De: Dr. Felipe Aizpuru Barandiaran
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

A: Julián Campos Fernández
Diater Laboratorio de Diagnóstico y Aplicaciones Terapéuticas S.A.
Parque Tecnológico Leganés
28918 Leganés (Madrid)

Ponemos en su conocimiento que el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Araba ha evaluado en reunión de fecha 22 de marzo de 2013, el ensayo clínico unicéntrico que se detalla a continuación:

CODIGO: DIA-APL-01-13 (nº expte. 2013-012)

TITULO: Ensayo clínico prospectivo, unicéntrico, abierto, controlado con método de referencia (diagnóstico clínico), para la obtención de la dosis óptima y seguridad de Amoxiciloil Octa-L-Lisina (APL), para el diagnóstico de alergia a aminopenicilinas y antibióticos afines mediante pruebas cutáneas.

Versión Protocolo: Versión 1 / 08 Marzo 2013

Versión HIP y CI: Versión 1/ 08 Marzo 2013

PROMOTOR: Diater Laboratorios

INVESTIGADORA PRINCIPAL: M^a Teresa Audicana

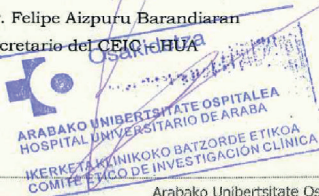
SERVICIO: Alergología (Sede Santiago)

Por la presente se les comunica que el Comité ha emitido un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización del ensayo en este Hospital.

Les recordamos que, tal y como está contemplado en nuestro procedimiento normalizado de trabajo, deben enviarnos notificación del inicio del estudio así como un informe semestral del desarrollo del mismo.

En Vitoria – Gasteiz, a 22 de marzo de 2013

Fdo.: Dr. Felipe Aizpuru Barandiaran
Secretario del CEIC-HUA



Arabako Unibertsitate Ospitalea - Hospital Universitario Araba
C/ Jose Atxotegi, s/n - 6º D 01009 Vitoria - Gasteiz Álava
Tel. 945 00 74 13 Fax. 945 00 73 36
unidadinvestigacion.alava@osakidetza.net

